

## 令和5年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

分担研究課題名: 曝露評価手法に関する調査研究

研究分担者: 小林 憲弘 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: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部・客員研究員

### 研究要旨

本研究班全体で得られたナノマテリアルの吸入曝露試験の結果を適切な管理基準に適用するためには、曝露シナリオを設定する必要がある。そこで本研究では、ナノ材料および先端材料のリスク評価の支援を目的とし、OECD を主とした中心とした国際機関におけるグループ化およびリードアクロスの方法について調査した。

2023年7月にOECDより「Test Guideline No.126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement (親和力計測によるナノマテリアルの疎水性指数の測定)」(以下、TG126)が出版されたことから、TG126について調査し、その内容を整理した。

TG126において疎水性指数(Hy)は「水が非極性分子を排除する傾向から生じる、水環境における非極性基または分子の会合」と定義される。様々な加工表面(コレクター)への結合率を測定することにより、HyはNMが非極性(疎水性)表面への結合を好む(水に対する親和性が低い)傾向を示す。この方法は推奨プロトコルを使用し、界面活性剤の有無に関わらず水溶液に分散されたNMまたはNM粉末に適用される。

Hyは他のパラメータの中でもナノマテリアルの様々な相互作用に関する情報をより多く提供する可能性があると考えられる。

### A. 研究目的

本研究班全体で得られたナノマテリアルの吸入曝露試験の結果を適切な管理基準に適用するためには、曝露シナリオを設定する必要がある。そこで本研究では、ナノ材料および先端材料のリスク評価の支援を目的とし、OECD を主とした中心とした国際機関におけるグループ化およびリードアクロスの方法について調査した。具体的には、OECDのナノマテリアル作業グループ(WPMN)の会合に参加し、曝露評価プロジェクト(SG8)で進められているプロジェクトの動向調査を行った。

### B. 研究方法

2023年7月にOECDより「Test Guideline No.126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement (親和力計測によるナノマテリアルの疎水性指数の測定)」(以下、TG126)が出版された。また、同9月には上記TG126に関するウェビナーが開催された。そこで、TG126<sup>1)</sup>を調査し、その内容を整理した。

OECD Guidelines for the Testing of

Chemicals, Section 1, Test Guideline No. 126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement

OECD Test Guideline No. 126 では、親和力 (affinity) 計測によるナノマテリアル (NMs) の疎水性指数 (Hy) の測定方法を記載している。

ガイドラインで、疎水性指数 (Hy) は「水が非極性分子を排除する傾向から生じる、水環境における非極性基または分子の会合」と定義される。

様々な加工表面 (コレクター) への結合率を測定することにより、Hy は NM が非極性 (疎水性) 表面への結合を好む (水に対する親和性が低い) 傾向を示す。

この方法は推奨プロトコルを使用し、界面活性剤の有無に関わらず水溶液に分散された NM または NM 粉末に適用される。

## C. 研究結果

### i) TG126 の背景

法的枠組み (REACH) では、オクタノール/水分配係数 (Kow) の報告が義務付けられている。Kow は、水環境における化学物質の挙動と輸送の指標であり、環境暴露モデルの主要パラメータや、ヒトへのリスク評価に用いられる。しかし、Kow はナノマテリアルの評価には適用されない。そこで、液体中の NM の挙動に関する情報を取得する手順を開発する必要がある。

疎水性は「OECD の工業ナノマテリアルの物理化学的決定枠組み」において関連パラメータとして指定されており、他のパラメータの中でも NM の相互作用に関する情報

をより多く提供する可能性がある。水生生物および陸生生物 (生物蓄積および残留性を含む)、ヒトの細胞表面との接触 (皮膚・肺を通じた人体への輸送と、その結果としての組織・器官への蓄積または血液循環からの除去を含む)。

化学物質の疎水性は次のような影響を与える

- 細胞への取り込み
- 毒性
- 免疫応答 / 免疫細胞相互作用
- 溶血
- タンパク質の吸着

疎水性、サイズ、表面電荷は、ナノ粒子の生体適合性に影響を与える主なパラメータである。欧州委員会 (EC) の JRC の、OECD テストガイドラインプログラム (TGP) へのナノマテリアルの疎水性に対処する新しい TG を開発する提案が、2019 年の TGP 作業計画の新規項目として受け入れられた。

最終的な新しい TG126「親和性測定によるナノマテリアルの疎水性指数の決定」が、2023 年に採用された。

### ii) 測定原理

この試験では、分散した NM と異なるコレクターとの結合率を測定することにより、NM の疎水性指数 (Hy) を定量化することができる (図 1)。コレクターは、異なる特性を示すように設計された表面である。パラメータ  $H^*$  は、NM が水相に留まらずに疎水性表面に結合する傾向を直接測定するものである。テストでは 3 種類のコレクターを使用する。疎水性コレクターは NM の疎水性を測定するもので、すなわち NM とコレクター

間の疎水性相互作用を伴う。他の2つのコレクターは親水性で、正と負に帯電しており、リファレンスとネガティブコントロールの役割を果たす。負に帯電した NM の場合、親水性の正に帯電したコレクターがリファレンスとなり、静電相互作用を促進することで結合率が最大になる。プラスに荷電した NM の場合、親水性のマイナスに荷電したコレクターがこの役割を果たす。参照コレクターへの結合率は、NM の表面への輸送によってのみ制限される。もう1つのコレクター (NM と同じ表面電荷を持つ) はネガティブコントロールである。疎水性インデックスは、疎水性コレクター上の NM の結合率と、参照コレクター (結合率が最大になる親水性コレクター) 上の NM の結合率との比の対数として定義される。コレクターは、異なる疎水性と表面電荷を示すように設計されている。それらは以下の特性を示す: - 非常に低い表面粗さ (<< NM サイズ) - 以下に述べるように表面自由エネルギーの極性成分のある値- 以下に述べるように測定媒体中のある  $\zeta$  電位。Owens-Fowkes-Wendt 理論によると、固体の全表面エネルギーは、 $\gamma$  LW (Lifschitz-van der Waals 成分) と呼ばれる分散成分 (非極性相互作用を考慮) と、 $\gamma$  AB (酸塩基成分) と呼ばれる極性成分の和である。 $\gamma$  AB が低い固体材料は「疎水性」とみなされる。固体の  $\gamma$  AB の増加は、その親水性の増加に対応する。疎水性コレクターは、熟練度試験のようにフルオロカーボンコーティングをベースとすることができ、非常に低い  $\gamma$  AB を提供する。その後、親水性材料の層を追加することで、 $\gamma$  AB を増加させることができる。

すでに水性媒体に分散している NM は、測

定を行う前にリン酸緩衝液 (PB) で希釈される。粉末の場合、NM は PB に分散される。疎水性の高い NM の分散を促進するために、界面活性剤を添加することができる。この場合、界面活性剤の濃度を漸減させながら (安定した分散を得ることができる最小濃度で)、4 回の測定を行う。各濃度で測定した  $H$  値から、界面活性剤無添加の NM の  $y$  値を外挿することができる ([界面活性剤]=0 における  $H_{yx}$ )。分散液は脱気された後、液体セルによってコレクターに注入され、表面に運ばれる。時間の関数としてコレクターに結合する粒子の数 (結合率) は、コレクターへの親和性を決定する。時間の関数としての結合粒子の画像化は、暗視野顕微鏡とカメラによって行われる。画像解析ソフトウェアを使用して、粒子を自動的に検出し、カウントし、結合曲線を作成する。結合粒子は、画像シーケンス上の位置を追跡することにより、結合していない粒子と区別される。テストは、異なるコレクターに結合する粒子の数を時間の関数として返す。これらの実験データは、最初に NM の疎水性を定性的に評価するために使用できる。

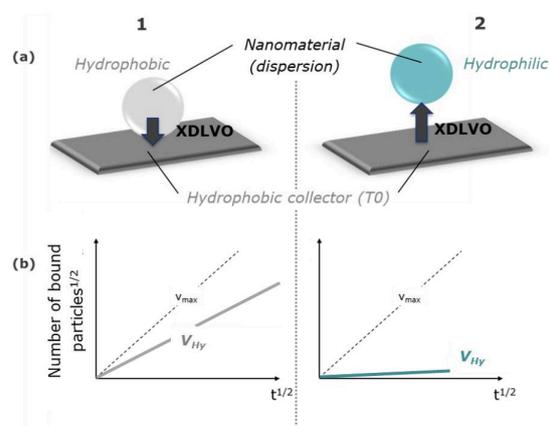


図 1.  $H_y$  の測定原理

$H_y$  は下記の式で表される。

$$H_y = \log(v_{Hy}/v_{max})$$

すなわち、ナノマテリアルの疎水性が高ければ、 $H_y$  は 0 に近づき、浸水性が高ければ、 $H_y < -1$  となる。 $H_y = -1$  であれば、 $T_5$  と比較して  $T_0$  に 10%結合していることを示す。

### iii) 方法の詳細

試料は水性媒体中に分散させ、脱気する必要がある。NM の表面特性や化学的性質を変化させることなく、安定性の条件を満たす分散を保証する分散プロトコルを使用することを推奨する。例えば、非常に強力な超音波処理プロトコルは、NM の表面からコーティングを除去する可能性があり、これは NM の特性を変化させるので避けるべきである。表面処理は、ここでは改質ではなく、被検物質固有の性質であり、この方法は表面処理された NM にも適用できる。水性媒体にすでに分散している NM を PB で希釈する。粉末状の場合、NM は PB に分散される。他の方法では分散しない疎水性の高い NM の分散を促進するために、界面活性剤を添加することができる。この場合、安定した分散を得るのに必要な最小濃度から始めて、界面活性剤の濃度を 4 段階上昇させた一連の溶液を調製する。それぞれ同じプロトコルに従って測定する。3 つの異なる表面またはコレクター（疎水性、陽性、陰性）を透明基板上に調製するか、機能化スライドプロバイダーから購入する。調製プロトコルの例

は、付録の「マイクロ流体セルの取り付け」に記載されている。暗視野顕微鏡で表面に焦点を合わせやすくするため、図 3 に示すように、コレクターをスライドの中央部（幅方向）に、横から縦にきれいに傷をつける必要がある。次に、各基板に、体積、表面、高さを制御したマイクロ流体セルを取り付ける。市販の多チャンネル粘着スライド（Ibidi 社製、6 チャンネル粘着スライドや Chipshop 社製 16 チャンネル粘着スライドなど）または自作のマイクロ流体セルを、試験手順で示した条件に従って測定に使用することができる。

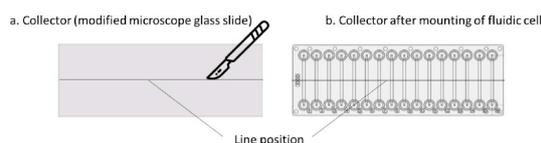


図 3. コレクターの準備方法

測定は、コレクターに電荷を掛け、結合している粒子数を暗視野顕微鏡により測定する。

1 フレームあたりのコレクターに結合する粒子数の測定は、フリーソフト ImageJ とその Trackmate プラグイン<sup>2</sup>を用いて行う。暗視野顕微鏡では、粒子は背景よりも明るい。粒子の検出は、ピクセル強度分布の閾値処理によって行われる。解析は、各フレームの粒子の自動検出と、一連のフレーム内の粒子の位置の追跡からなる。最後のフレームから数えて 2 フレーム以上連続して動いていないオブジェクトがカウントされる。この自動計算により、1 フレームあたりの結合粒子数が定量化される。時間は、フレーム番号にフレーム遅延 (30 秒) を掛けることによって計算され、コレクタ上の物質の結合

速度に対応する単位時間あたりの結合粒子の数に達する。結果のテキストファイルは、フィッティング用のデータ処理ソフトウェアにインポートできる<sup>34</sup>。各コレクター上の結合粒子数を時間の平方根の関数としてプロットすると、図4に示すような線形トレンドラインが得られる。この関数はコレクターごとに計算される。これは、Microsoft Excel<sup>®</sup> または任意の種類データ処理ソフトウェアで利用可能なフィッティングウィザードを使用して、線形関数でフィッティングできる。フィットは、異なるコレクターにNMが結合する速度を表す $v$ と呼ばれる直線の傾きを返す。

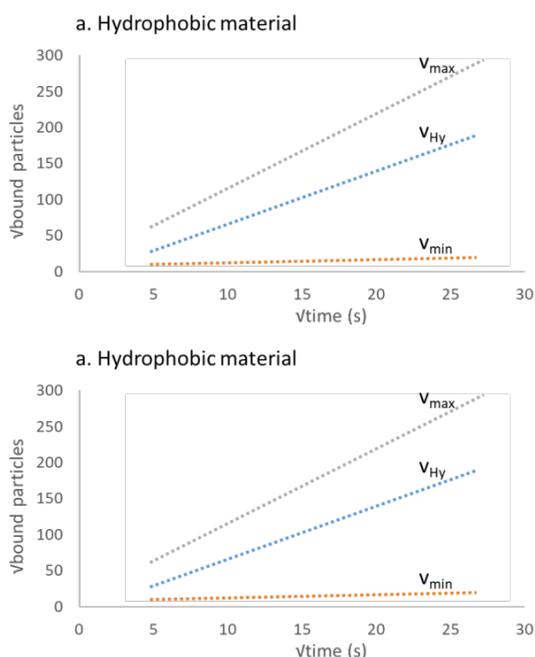


図4. 疎水性 (a) 及び親水性 (b) 物質の解析結果の例

結合速度は、疎水性コレクターの結合速度  $v_{Hy}$  と、支配的な静電引力  $v_{max}$  を示す親水性コレクター（測定媒体中で一般的なように、負に帯電した物質に対しては親水性

の正に帯電したコレクター、正に帯電した物質に対しては親水性の負に帯電したコレクター) の結合速度の値の比の対数として定義される疎水性指数  $H_y$  の計算に使用される。この指数の値が  $0 \sim -1$  である場合、NMは疎水性であるとみなされ、 $-1$  より低い値を示す場合は親水性であるとみなされる。 $0$  に近いほど疎水性が高い。界面活性剤を使用して分散を行う疎水性NMの場合、界面活性剤の各濃度について  $H^*$ <sup>146</sup> の値が計算される。それぞれの  $H$  は、界面活性剤によって特性が変更された NM の疎水性指数に対応する。次にこれらの値をプロットし、界面活性剤無添加の  $\hat{H}_0$  の値を線形回帰によって外挿する (図5)。この外挿は、 $a$  が界面活性剤濃度に直線的に比例する濃度範囲で行われる。プロットが直線的でない場合は、飽和を避けるために界面活性剤濃度を下げる必要がある。最初の定性的評価は、試験媒体中へのNMの分散性から得られる。この条件が達成できない場合、NMは疎水性が高いと考えられ、 $H^*$  は  $0$  に近いと仮定される。この場合  $H^*$  を定量化するために、疎水性の高いNMの分散を促進する界面活性剤を添加しする。

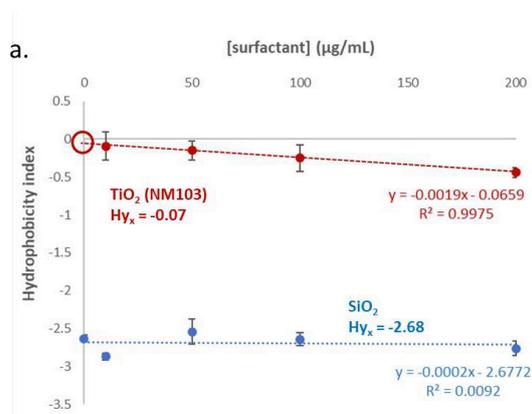


図5. 疎水性NM (NM103、疎水性コーティング)

グ TiO<sub>2</sub>)、および親水性 NM (SiO<sub>2</sub>) を、界面活性剤の濃度を減少させながら測定した結果に基づく。 $H^{\infty}$  は、[界面活性剤]=0 に対する外挿値。

$vH_y/v_{max}$  の比の対数を用いて  $H_y$  を計算することで、測定された NM の疎水性指数を定量的に評価することができる。 $H$  が負の値であればあるほど、その NM は疎水性が低いことを意味する。図 6 に測定物質の指標を示す。

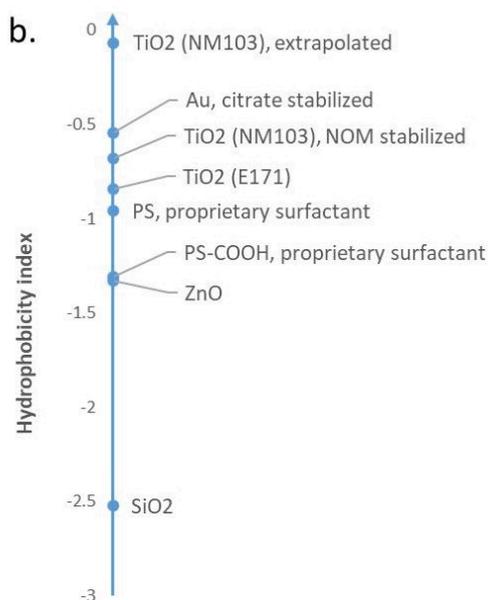


図 6. 本方法で試験した材料の疎水性指数 ( $H^{\infty}$ ) の指標スケール。0 に近いほど疎水性が高い。

#### D. 考察・結論

$H_y$  の潜在的な利用可能性として、次の 3 点が挙げられる。

1. ナノ粒子の環境中挙動の指標として使えらる。カルボキシル基が付加したポリスチレンでは、-COOH の含量が増加するほど、疎水性が減少す

ることが報告されている。

2. また、生物濃縮性の指標としても活用できると考えられる。 $H_y$  が高いほど、微生物への吸着量が増加することが報告されている。
3. さらに、異なる種類のナノ粒子の凝集の指標としても活用できる可能性がある。

以上のことから、 $H_y$  は他の物性パラメータの中でもナノマテリアルの様々な相互作用に関する情報をより多く提供することができると考えられる。

#### E. 参考文献等

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, Test Guideline No.126: Determination of the Hydrophobicity Index of Nanomaterials Through an Affinity Measurement  
<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/ae9c0fd1-en.pdf?expires=1715147292&id=id&accnam=e=guest&checksum=47DCC75ECFD45C482035BD9EFFB0EC67>

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (該当なし)
2. 実用新案登録 (該当なし)
3. その他 (該当なし)