

毒性実験のためのナノ二酸化チタン(P25)分散液の調製法

小林 健一, *1久保田 久代*1, 北條 理恵子*1, 長谷川 也須子*1, 宮川 宗之*2

ナノ粒子の分散方法は標準化されたプロトコールに関する知見が少なく, その結果, 方法によって不均一かつ不十分な分散粒子を調製している可能性がある. ナノ粒子の毒性実験を行うに当たり溶媒に溶解したナノ粒子を単一の粒径かつ安定した分散性を保った状態の調製が求められる. 本研究では粉体試料として, ナノ二酸化チタン(アナターゼ・ルチル結晶相混在型 TiO_2 ; P25)を, 分散液は5種類の超純水(UPW), 0.2%リン酸水素二ナトリウム水(DSP), リン酸緩衝生理食塩水(PBS), 生理食塩水(S)および0.05%界面活性剤添加生理食塩水(ST)を対象として各組み合わせの懸濁液を超音波処理・遠心分離によって得られた上澄液を回収し, 動的光散乱法による散乱強度分布の測定を実施した. また超音波処理時間および容量の最適条件, 長期的な安定性を検討した. その結果から, P25はUPWおよびDSPにおいて平均粒径70-80nm付近で単一ピークとなる安定的な粒径分布を示した. PBS, SおよびSTについては, ピークが不検出あるいは複数のピークが検出され, 良好な粒径分布は得られなかった. 超音波処理時間および容量の最適条件については, 懸濁液を10mlの容量, 30分間の超音波処理・遠心分離後の上澄液を用いると, 少なくとも90日後に至るまでほぼ一定に安定な粒子径を示すことがわかった.

キーワード: 二酸化チタン, ナノ粒子, P25, 動的光散乱法

1 はじめに

ナノマテリアルとは, 非結合の状態もしくは凝集体(aggregateまたはagglomerate)として, 50%以上の数の粒子の1つ以上の外径を有する天然物, 偶発的あるいは工業的に製造された材料と定義される¹⁾. ナノ粒子は100nm以下の粒子径ゆえ, サイズ依存的な新たな物理化学的性質を生み出している²⁾. その中でも二酸化チタン(TiO_2)は広範に生産され, 白色顔料, 医療, 食品添加物, 工業用途等に使用されてきている³⁾. TiO_2 特異的な生殖発達毒性は報告されているものの⁴⁻⁸⁾, 粒子調製法やその測定方法の相違が毒性影響の程度に差異をもたらしていると考えられる. TiO_2 ナノ粒子の有害影響については現在までのところ不明であり, その安全性および有害性に関する情報の収集が急務であると考えられる⁹⁾.

ナノ粒子の調製プロトコールはこれまでいくつか報告されてきている¹⁰⁻¹⁴⁾. ナノ粒子はその大きい比表面積のためにより大きな凝集体を形成しやすい傾向がある. 粒径が小さくなるほど比表面積が増大する. 粒径および表面積に起因する物理化学的性質は, 毒性学的に考慮しなければならない特性であり¹⁵⁾, ナノ粒子の凝集しやすさがゆえにその安定性を保ち, 長期間にわたって aggregateあるいはagglomerateしない適切なプロトコールの適用が必要である. 安定性の高い粒子の調製は信用性の高い実験データを担保することにつながる考えられる.

TiO_2 は天然において3種類の結晶構造を有し, それら

はアナターゼ型(正方晶), ルチル型(正方晶)およびブルッカイト型(斜方晶)に分類される. 本研究では, 触媒担体や, 光触媒反応の活性成分として産業に多方面に用いられてきている市販のP25(アナターゼ型:ルチル型=約8:2混合組成)を用いて, 毒性実験のための水分散系における TiO_2 ナノ粒子の調製法を検討することとした. P25の物性に関しては, Ohtaniら¹⁶⁾によって報告されてきている. 本法では, 超音波分散と遠心分離の組み合わせによる粒子調製を行い, 遠心分離後の上澄液の性状解析を動的光散乱法により実施した.

2 材料と方法

1) 試薬

P25(純度99.5%以上, 一次粒径~21nm, 比表面積~50 m^2/g), リン酸緩衝生理食塩水(PBS)およびTween 80はシグマ・アルドリッチ社(米国)より, 塩化ナトリウムおよびリン酸水素二ナトリウムは和光純薬工業より購入した. 実験に使用した5種類の分散液は超純水(UPW), 0.2%リン酸水素二ナトリウム水(DSP), PBS, 生理食塩水(S)および0.05%界面活性剤添加生理食塩水(ST)を対象とした.

2) TiO_2 の粒径測定と濃度測定

超音波処理はultrasonic cleaner(ブランソン社, 米国, 5510-DTH, 180W, 40kHz)を用いた. バス水面はガラス製ねじ口管びん(100ml, 日電理化学硝子)に入れた懸濁液の液面に合わせ, 本装置のバス内に3か所存在する発信子付近にスクリー管を設置し, なるべく強い共振が得られるよう設置した. 各上澄液から得られた最終調製液粒径測定(ゼータ電位および多分散指数)は, ゼータサイザーナノZS(マルパーン社, 英国)を用いて, 動的光散乱法により測定した. 各組み合わせの懸濁液を

*1(独)労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ

*2 帝京大学医療技術学部スポーツ医療学科

連絡先: 〒214-8585 神奈川県川崎市多摩区長尾6-21-1

労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ 小林健一*1

E-mail: kobayashi@h.jniosh.go.jp

超音波処理・遠心分離によって得られた上澄液を回収し、動的光散乱法による散乱強度分布の測定を行った。粒子濃度の測定は、Endoh¹⁷⁾の方法を参考に重量乾燥法により行った。最終調製液 1ml をガラス製ねじ口管びん (5ml) に入れ 120 分、200°C の条件で乾燥した。同時に分散媒のみを同条件で乾燥させた質量から前者の重量を差し引き TiO₂ の純量として算出した。

3) 実験 1

P25 が適切な分散剤によって二次粒子の粒子径が 100 nm 以下になるように分散条件を検討するため、前述 5 種類の分散媒を用いて分散の性状を比較した。P25 はガラス製ねじ口管びん (100ml) に 0.2g/10ml の濃度で懸濁し、十分にボルテックスした後、30 分間の超音波処理を行った。その後懸濁液を遠沈管 (10ml) に移し、60 分間、1,000g、室温で遠心分離し、その上澄液を 5ml 採取し、最終調製液として粒径測定 (ゼータ電位および多分散指数) を行った。

4) 実験 2

P25 が効率良く分散される超音波時間を検討するため、実験 1 で検討した 30 分と先行研究¹⁷⁾で採用されていた時間を参考にして、二時点の超音波時間による粒径の違いを比較した。P25 (2g) を 100ml の DSP に懸濁しストック液とした。50ml の懸濁液をガラス製ねじ口管びん (100ml) に採取し、各懸濁液は十分にボルテックスした後、30 分あるいは 120 分の超音波処理を行った。その後懸濁液を遠沈管 (50ml) に移し、60 分間、1,000g、室温で遠心分離し、その上澄液を 25ml 採取し、最終調製液として粒径測定 (ゼータ電位および多分散指数) を行った。

5) 実験 3

P25 が効率良く分散される容量を検討するため、実験 1 および実験 2 で試みた容量 (10ml および 50ml) の間の容量依存による粒径の違いを比較した。ストック液は実験 2 と同様に調製した。分散に適切な用量の検討のために、10ml、30ml あるいは 50ml の懸濁液をガラス製ねじ口管びん (100ml) に採取した。各懸濁液は十分にボルテックスした後、30 分の超音波処理を行った。その後懸濁液を遠沈管に移し、60 分間、1,000g、室温で遠心分離し、その上澄液をそれぞれ 5、15 および 25ml 採取し、最終調製液として粒径測定 (ゼータ電位および多分散指数) を行った。

6) 実験 4

P25 の長期的な安定性を確かめるため、1ロットから得られた最終調製液を経時的に分取し、調製 0 日後から 90 日後まで粒径測定 (ゼータ電位および多分散指数) および粒子濃度の算出を行った。P25 (2g) を 100ml の DSP あるいは UPW に懸濁し、ストック液とした。調製した粒子の長期間の安定性を検討する目的で、懸濁液

10ml ずつをガラス製ねじ口管びん (100ml) ・10 本に分注し、遠心分離を行う群 (5 本) と行わない群 (5 本) の二群にランダムに分けた。各懸濁液は十分にボルテックスした後、30 分間の超音波処理を行った。遠心分離を行う群は、懸濁液を遠沈管 (10ml) に移し、60 分間、1,000g、室温で遠心分離し、その上澄液を各遠心管から 5ml ずつ採取・プールし、最終調製液として粒径測定 (ゼータ電位および多分散指数) および粒子濃度の算出を調製後 90 日までを行った。

3 結果

本研究では、様々な種類の分散媒を用いて P25 の分散媒、超音波時間および容量の組み合わせにおいて、適切な条件を検討するとともに、安定性を観察した。特に今回の研究では、毒性実験に用いるために適切な P25 の分散条件を確定することを目的とした。実験 1 の結果より、P25 の分散は UPW および DSP を用いたときに分散が良好であった。ゼータ電位はそれぞれ 76 ± 2 および 80 ± 2 nm (平均値 \pm 標準偏差、以下同様) (n=3)、多分散指数はそれぞれ 0.12 ± 0.01 および 0.15 ± 0.01 (n=3) であった。一方、同条件下で PBS、S あるいは ST で P25 懸濁液を調製した場合、良好な粒径分布が得られなかった。これら 3 種分散媒は TiO₂ ナノ粒子の調製には適さないと考えられた。したがって、以降の実験においては、分散媒に UPW および DSP を採用することとした。実験 2 の結果より、懸濁液を 50ml の容量で 30 分あるいは 120 分間超音波処理した際は、粒径は同程度であった。ゼータ電位はそれぞれ 90 ± 2 および 87 ± 1 nm (n=3)、多分散指数はそれぞれ 0.12 ± 0.01 および 0.13 ± 0.01 (n=3) であった。実験 3 の結果より、ゼータ電位は容量依存的に上昇した (10ml: 74 ± 1 nm (n=6), 30ml: 78 ± 1 nm (n=3), 50ml: 90 ± 2 nm (n=3))。多分散指数は群間でほぼ一定であった (0.12 ~ 0.13)。以上の結果を踏まえて、以降の実験では超音波処理時間を 30 分、超音波容量を 10ml と固定して P25 粒子の安定性を調べることにした。実験 4 の結果より、P25 の 90 日間の安定性の確認を行った。0.2% DSP において実験 3 と同条件のストック液を用いて、TiO₂ ナノ粒子の調製を行ったところ、調製 0 日から 90 日後に至るまでほぼ一定の粒子径 (ゼータ電位: 約 76nm, 多分散指数: 約 0.13, 各時点 n=3) を示した。UPW についても、調製 0 日から 90 日後に至るまでほぼ一定の粒子径 (ゼータ電位: 約 81nm, 多分散指数: 約 0.1, 各時点 n=4) を示した。粒子濃度についても 90 日後に至るまでほぼ一定であった。なお、遠心分離を行わない最終調製液においては、遠心分離を行った最終調製液と比べ、増大していたが調製 0 日から 90 日後に至るまでほぼ一定の粒子径であった。

4 考察

ナノ粒子の分散方法については、標準化されたプロトコールがこれまで確立されていないため、研究者間で異なる方法が採用されており、そのことが実験間の異なる

結果や多様性をもたらしていると考えられる。超音波照射はナノ粒子を分散させる方法として行われてきているが、欠点も指摘されている¹⁸⁾。また、動的光散乱法はナノ粒子の測定に広範に使用されてきているが、測定機器や方法の相違により異なる粒径が測定されることも考えられる。

本研究では、水分散系における P25 の調製の至適プロトコールを検討した。P25 のサイズは分散媒と容量の組み合わせに依存していた。0.2% DSP は P25 の分散安定性に約 7 日間確保できるとの報告がされているが¹⁷⁾、本実験では超音波処理時間は 30 分で十分であり、少なくとも 90 日まで安定性があることを認めた。このことは一回の実験を通じて反復投与実験の際に、1 回の調製ロットを安定的に繰り返し使える利点がある。実験 1 において、P25 は、UPW あるいは DSP で良好に分散されたにもかかわらず、PBS、S あるいは ST では良好な分散を得ることができなかった。これらの 3 種類の分散媒は既報で用いられている方法であり^{4,14)}、本研究でも候補分散媒として検討を行なった。調製実験条件の相違（超音波出力、容量等）があったが、詳細な理由は不明であった。本実験では最終調製液 P25 の形態学的観察までは行えなかったため、さらなる粒径の解析に今後の課題として追加が必要である。P25 が混合物である特殊性を考慮すると、分散液の調製過程において、結晶構造の混合組成（アナターゼ型：ルチル型＝約 8：2）に変化がないか確認する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するあたり、独立行政法人労働安全衛生総合研究所環境計測研究グループ鷹屋光俊博士に動的光散乱法を用いた P25 の粒子径計測に関してご指導をいただくとともに、粒子の調製方法にご意見をいただいた。ここに謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) European Commission 2011/696/EU. Recommendation of 18 October 2011 on the definition of a nanomaterial. Available at: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm; Accessed May 6, 2015
- 2) Tsuzuki T. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. *Int. J. Nanotechnol.* 2009; 6: 5/6, 567.
- 3) Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre. Toxicol.* 2013; 10: 15.
- 4) Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, et al. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J. Health Sci.* 2009; 55: 95-102.
- 5) Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nanotechnol.* 2011; 6: 321-328.
- 6) Gao G, Ze Y, Zhao X, Sang X, Zheng L, Ze X, et al. Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J. Hazard. Mater.* 2013; 258-259: 133-143.
- 7) Zhao X, Ze Y, Gao G, Sang X, Li B, Gui S. et al. Nanosized TiO₂-induced reproductive system dysfunction and its mechanism in female mice. *PLoS One.* 2013; 8: e59378.
- 8) Jia F, Sun Z, Yan X, Zhou B, Wang J. Effect of pubertal nano-TiO₂ exposure on testosterone synthesis and spermatogenesis in mice. *Arch. Toxicol.* 2014; 88: 781-788.
- 9) Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health. Perspect.* 2005; 113: 823-839.
- 10) Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, et al. Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies. *Part. Fibre. Toxicol.* 2008; 5: 14.
- 11) Horie M, Fukui H, Endoh S, Maru J, Miyauchi A, Shichiri M, et al. Comparison of acute oxidative stress on rat lung induced by nano and fine-scale, soluble and insoluble metal oxide particles: NiO and TiO₂. *Inhal. Toxicol.* 2010; 24: 391-400.
- 12) Kim SC, Chen DR, Qi C, Gelein RM, Finkelstein JN, Elder, A. et al. A nanoparticle dispersion method for *in vitro* and *in vivo* nanotoxicity study. *Nanotoxicology.* 2010; 4: 42-51.
- 13) 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.* 2009; 64 (1-2): 110-118.
- 14) Wu W, Ichihara G, Suzuki Y, Izuoka K, Oikawa-Tada S, Chang J., et al. Dispersion method for safety research on manufactured nanomaterials. *Ind. Health.* 2014; 52: 54-65.
- 15) Sager TM, Porter DW, Robinson VA, Lindsley WG, Schwegler-Berry DE, Castranova V. Improved method to disperse nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* investigation of toxicity. *Nanotoxicology.* 1, 2007; 1: 118-129.
- 16) Ohtani, B. Prieto-Mahaney, O.O., Li, D., Abe, R. What is Degussa (Evonik) P25? Crystalline composition analysis, reconstruction from isolated pure particles and photocatalytic activity test. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2010; 216: 179-182.

- 17) Endoh S. Preparation methods of titanium dioxide nanoparticle samples of liquid phase dispersion for *in vivo* studies – ultrasonication method. *Advanced Industrial Science and Technology*. 2011; pp.133-139.
- 18) Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment issues and recommendations. *Nanotoxicology*. 2011; 5: 711-729.