

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22686072

研究課題名（和文） ナノ粒子の生体影響に関する単一粒子・単一細胞レベルの基礎的研究

研究課題名（英文） Impacts of nanoparticles on living bodies studied at the single-particle, single-cell level

研究代表者

新戸 浩幸（SHINTO HIROYUKI）

京都大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：80324656

研究成果の概要（和文）：ナノ粒子が、種々の動物細胞に及ぼす影響について検討した。ナノ粒子による細胞影響の因子は、粒子の暴露濃度・暴露時間の他に、粒子の物理・化学的性質（粒子径、粒子表面の化学的性質）、暴露温度、培地中血清濃度であること、これら因子のバランスがナノ粒子の細胞影響を決定することがわかった。特に、シリカ粒子について、粒子のサイズと表面特性が「細胞への付着、取り込み、毒性」にどのように影響するのかを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the impacts of nanoparticles on the different types of mammalian cells. It was found that the influential factors include not only the particle concentration and the incubation time, but the physicochemical properties of the particles, the incubation temperature, and the serum concentration in culture media, and that a balance among these factors determines the cellular responses. Especially, we have revealed the general mechanism how the size and surface properties of the particles affect the cell adhesion, cellular uptake, and cytotoxicity.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2011年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	17,600,000	5,280,000	22,880,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：ナノ粒子、表面官能基、接着性動物細胞、浮遊性動物細胞、赤血球、膜損傷、付着、飲食用

## 1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子は、粒子径が数百 nm 以下の粒子で、比表面積が極めて大きいことから、高い表面活性を示すだけでなく、従来の粒子とは異なる性質をも示す。ナノ粒子は、触媒や電子部品などの工業製品だけではなく、医薬

品、化粧品、食品などにも利用されており、我々の身近な存在になりつつある。しかし、工業的には利点となるナノ粒子の特異的性質がどのようにヒトや環境に影響を及ぼすのかよくわかっていない。この問題はナノリスクと呼ばれ、近年、産業的にも社会的にも

広く重要視されつつあるため、ナノ粒子の生体影響を明らかにすることは緊急課題である。

## 2. 研究の目的

本研究では、無機酸化物ナノ粒子と培養細胞を用いて単一粒子・単一細胞レベルの基礎的かつ系統的な実験を行い、ナノ粒子の「サイズ、表面特性」が「細胞への付着・脱着、摂取・排出、毒性」にどのように影響するかを、コロイド科学と細胞生物学の双方の視点から明確にする。さらに、ナノ粒子の細胞影響因子を決定し、そのメカニズムの全体像を明らかにする。このようなナノ粒子の適正な評価により、ナノリスク問題に一石を投じ、産業と社会に貢献する。

## 3. 研究の方法

物理・化学的性質が均質な無機酸化物ナノ粒子、およびシランカップリング剤で種々の表面官能基が付けられたナノ粒子を用いて、細胞生存性・細胞毒性の各種試験を行うとともに、ナノ粒子暴露後の細胞とナノ粒子の挙動観測を各種顕微鏡法（光学顕微鏡、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡）により単一細胞・単一粒子レベルで行う。本研究では、ナノ粒子の1次粒径、2次粒径、濃度、表面電位をあらかじめ高精度で評価しておくことにより、ナノ粒子の細胞影響をより適正に行う。また、ナノ粒子がヒトに暴露された際の主なターゲットは皮膚と肺であることを考慮して、経皮モデルとしてSK-MEL-28（ヒト皮膚がん由来メラノーマ細胞）、経気モデルとしてA549（ヒト肺がん由来上皮細胞）、典型的な正常細胞としてTIG-3（ヒト胎児肺由来繊維芽細胞）などを用いる。細胞膜損傷度を細胞種横断的に検討するため、由来・素性の極めて異なる細胞である接着性動物細胞（B16F10）、浮遊性動物細胞（Jurkat）、赤血球を用いた。

## 4. 研究成果

無機酸化物ナノ粒子のモデル粒子として、種々の表面官能基が付けられたシリカ粒子を主に用いた。得られた成果の概要は、以下の通りである。

(1) ナノ粒子による細胞影響の因子は、粒子の暴露濃度・暴露時間の他に、粒子の物理・化学的性質（粒子径、粒子表面の化学的性質）、暴露温度、培地中血清濃度である。これら因子のバランスがナノ粒子の細胞影響を決定する。

(2) シリカ粒子の表面修飾基の有無は、表面修飾基の種類よりも、細胞応答を劇的かつ短時間で変化させた（図1）。この短時間の細胞応答とは、無修飾シリカ粒子による膜損傷で

ある。シリカ粒子が表面修飾基をもつ場合、シリカ粒子は細胞内に取り込まれ、長時間経過しないと毒性などの細胞応答は見られなかった。

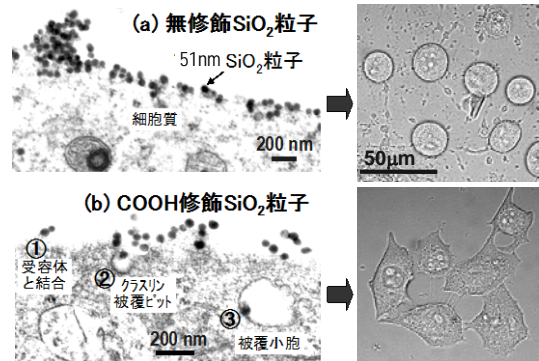


図1 無血清培地中で51 nm シリカ粒子曝露後の付着性細胞 B16F10：（左）細胞膜近傍の透過型電子顕微鏡像、（右）細胞全体の光学顕微鏡像

(3) 細胞種に依らず、無修飾シリカ粒子由来の細胞膜損傷性は、粒子の総表面積が大きいほど高くなった（図2, 3）。この結果から、膜損傷性はシラノール基数に依存すると考えられる。

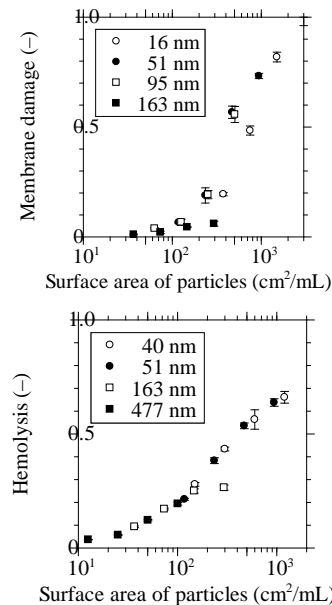


図2 上：付着性細胞 B16F10 に対する無修飾シリカ粒子の膜損傷性（暴露時間 0.5 h、暴露温度 37°C）。下：ウサギ赤血球に対する無修飾シリカ粒子の膜損傷性（暴露時間 4 h、暴露温度 37°C）

(4) 細胞腫に依らず、無修飾シリカ粒子による細胞膜損傷性は、曝露温度（4~37°C）が高いほど高くなった（図3）。この結果から、膜損傷性は膜流動性に依存していると考えられる。

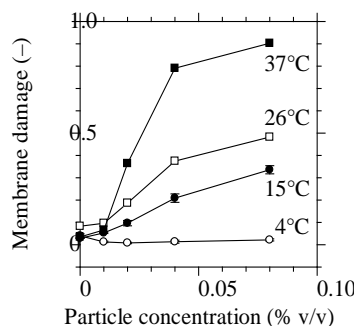


図3 付着性細胞 B16F10 に対する 51 nm 無修飾 SiO<sub>2</sub> 粒子の膜損傷性の暴露温度依存性(暴露時間 2 h)

(5) 細胞腫に依らず、無修飾シリカ粒子が懸濁されている培養溶液への血清の添加により、膜損傷性が低くなった。血清による膜損傷性の低減は、血清タンパクがシリカ粒子表面を被覆することで細胞との相互作用を低減することに由来すると考えられる。

以上の結果により、シリカ粒子由来の細胞膜損傷性には、細胞種に依らず普遍性があること、この原因は粒子表面と細胞膜表面による相互作用であることが考えられる。

今後の研究では、無修飾シリカ粒子による細胞膜損傷に焦点を絞り、シリカ粒子暴露後の単一細胞・単一粒子レベルのタイムラプス観察を主に行う予定で或る。これにより、シリカ粒子由来の細胞膜損傷性について、そのメカニズムの詳細を明らかにしたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① H. Shinto, T. Hirata, T. Fukasawa, S. Fujii, H. Maeda, M. Okada, Y. Nakamura, T. Furuzono, “Effect of Interfacial Serum Proteins on Melanoma Cell Adhesion to Biodegradable Poly(L-Lactic Acid) Microspheres Coated with Hydroxyapatite”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 2013, 8-15, 査読有  
doi:10.1016/j.colsurfb.2013.02.021  
http://hdl.handle.net/2433/173348
- ② H. Shinto, Y. Ohta, T. Fukasawa, “Adhesion of Melanoma Cells to the Microsphere Surface is Reduced by Exposure to Nanoparticles”, *Advanced Powder Technology*, 23, 2012, 693-699,

査読有

doi:10.1016/j.appt.2012.05.004

http://hdl.handle.net/2433/160280

- ③ H. Shinto, Y. Ohta, T. Fukasawa, “Adhesion of Melanoma Cells to the Surfaces of Microspheres Studied by Atomic Force Microscopy”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91, 2012, 114-121, 査読有  
doi:10.1016/j.colsurfb.2011.10.060  
http://hdl.handle.net/2433/152876
- ④ 新戸浩幸, “培養細胞を用いたナノ粒子の毒性試験法”, *粉体工学学会誌*, 47, 2010, 561-568, 査読無  
http://ci.nii.ac.jp/naid/10026547713

[学会発表] (計 19 件)

- ① 新戸浩幸, “ナノ粒子による生体膜破壊の普遍性”, 微粒子科学技術研究センター「連携要素B ワークショップ」, 2013年5月18日, 京都
- ② 新戸浩幸, “動物細胞と粒子の相互作用に関する一考察”, 同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター「ナノ・バイオシステムにおける階層構造の構築と利用」, 2013年3月21日, 京都
- ③ 新戸浩幸, “ナノ粒子の生体膜への付着と膜損傷”, 粉体技術セミナー「ナノ粒子のリスクとその対策」, 2012年12月14日, 京都
- ④ 新戸浩幸, 太田善規, 深澤智典, “ナノ粒子への曝露によるメラノーマ細胞の接着力の变化”, 第50回粉体に関する討論会, 2012年10月31日, 京都
- ⑤ 吉末幸祐, 深澤智典, 新戸浩幸, “赤血球をモデルとしたナノ粒子由来の細胞毒性評価”, 粉体工学学会 2012年度春期研究発表会, 2012年5月23日, 京都
- ⑥ 新戸浩幸, “微粒子の生体膜への付着と膜損傷”, 粉体工学学会 2012年度春期研究発表会, 2012年5月23日, 京都
- ⑦ 新戸浩幸, 深澤智典, “ソフトマテリアルと微粒子との相互作用”, 粉体工学学会 2011年度秋期研究発表会, 2011年10月19日, 大阪
- ⑧ 深澤智典, 新戸浩幸, “各種顕微鏡法によるシリカ粒子暴露後の生細胞の形態観察”, 化学工学学会第43回秋季大会, 2011年9月15日, 名古屋
- ⑨ 新戸浩幸, “微粒子と動物細胞との相互作用: 付着、取り込み、毒性”, 化学工学学会第43回秋季大会, 2011年9月14日, 名古屋
- ⑩ 深澤智典, 新戸浩幸, “生細胞に対するシリカナノ粒子の付着と膜破壊”, 第63回コロイドおよび界面化学討論会, 2011年9月7~9日, 京都

- |   |   |
|---|---|
| <p>⑪ 深澤智典, 新戸浩幸, “SEM によるシリカ粒子暴露後の動物細胞の形態観察”, 粉体工学会 2011 年度春期研究発表会, 2011 年 5 月 25 日, 東京</p> <p>⑫ 新戸浩幸, “細胞と粒子の相互作用に関する基礎的研究”, 微粒子科学技術研究センター 講演会, 2011 年 3 月 11 日, 京都</p> <p>⑬ 新戸浩幸, 深澤智典, “シリカ粒子の動物細胞への付着・取り込みと細胞毒性”, 材料化学システム工学討論会, 2010 年 12 月 4 日, 京都</p> <p>⑭ H. Shinto, T. Fukasawa, “Interactions between mammalian cells and nanoparticles: Adhesion, uptake and cytotoxicity”, Core-to-Core 2010 World Network Seminar on Advanced Particle Science and Technology, 2010 年 11 月 26 日, 京都</p> <p>⑮ 新戸浩幸, “動物細胞と粒子の相互作用に関する一考察”, ライフサイエンス産学連携研究センター学術講演会 ミニシンポジウム「ナノ粒子—そのリスクとベネフィットを考える」, 2010 年 10 月 4 日, 神戸</p> <p>⑯ H. Shinto, R. Miyagawa, Y. Ohta, K. Higashitani, “Interactions of Particles with Mammalian Cells: Adhesion, Uptake, and Cytotoxicity”, International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science (NCSS2010), 2010 年 9 月 22 日, 幕張</p> <p>⑰ 深澤智典, 岩井祐樹, 宮坂昌宏, 新戸浩幸, “ナノシリカ粒子の動物細胞への付着・取り込みと細胞毒性”, 粉体工学会 第 46 回夏期シンポジウム「ナノ粒子・人工材料と相互作用する生物—細胞を中心に生体関連物質から生体まで—」, 2010 年 8 月 10 日, 京都</p> <p>⑱ 新戸浩幸, 東谷公, “原子間力顕微鏡による動物細胞・マイクロ粒子表面間の接着力の直接測定”, 粉体工学会 第 46 回夏期シンポジウム「ナノ粒子・人工材料と相互作用する生物—細胞を中心に生体関連物質から生体まで—」, 2010 年 8 月 9 日, 京都</p> <p>⑲ 新戸浩幸, 岩井祐樹, 宮坂昌宏, “種々の動物細胞へのナノシリカ粒子の付着・取り込みと毒性”, 粉体工学会 2010 年度春期研究発表会, 2010 年 5 月 26 日, 京都</p> | <p>(2) 研究分担者<br/>なし</p> <p>(3) 連携研究者<br/>なし</p> |
|---|---|

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新戸 浩幸 (SHINTO HIROYUKI)

京都大学・工学研究科・講師

研究者番号: 80324656