

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790659

研究課題名（和文） ナノ粒子の表面電位と嗅神経を介した脳への移行量との関係

研究課題名（英文） Relationship between surface potential of nanoparticle and translocation to brain via olfactory nerve

## 研究代表者

松井 康人（YASUTO MATSUI）

京都大学・工学研究科・講師

研究者番号：50533501

研究成果の概要（和文）：ヒトⅡ型肺胞上皮細胞に表面修飾の異なる3種類の蛍光ナノ粒子を曝露させ、曝露時間と物性による取り込み量の違いを比較した。また、表面電位を変化させた同一修飾を有するナノ粒子において、表面電位が取り込みに関与するのかが確認した。その結果、曝露時間が長い程、取り込みは多くなるが、粒子の種類によって大きく異なり、また、粒子の表面電位が取り込み量に関与する可能性は低く、表面修飾に関与する可能性が高いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have shown that cellular uptake of nanoparticles depends on diameter, superficial area or surface modification. In this study, we examined that amounts of cellular uptake rely on it by measuring their zeta potential. We suspended 4 different surface modification fluorescent particles and measured their zeta potential and administered each of them to A549 cells, and employed confocal scanning laser microscopy. After thirty minute added particles to cells, we washed these cells three times and detected fluorescence by flow cytometer. Almost all the carboxylate particles invaded a cell and about 60 % aminated them also invaded. On the other hand, few non-modification particles were taken up.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：衛生

科研費の分科・細目：

キーワード：ナノ材料、衛生、細胞・組織、脳・神経、ナノバイオ

## 1. 研究開始当初の背景

ISOでは、2005年にナノテクノロジー分野の国際標準化を推進するために専門委員会（TC229）を設置した。TC229では、ナノ物質の毒性との関連が懸念されるパラメーターとして、8つの物理化学的パラメーターすなわち粒径、凝集状態、形状、表面電荷、溶解性、表面修飾、表面積、化学組成を発表した。各国でもナノ物質のリスク評価に関する研究を遂行している。米国では、国家ナノテクノロジー戦略（NNI）において環境保護庁（EPA）や国立労働安全衛生研究所（NIOSH）を中心

にナノ物質のリスク評価管理を進めている。しかしながら、ナノ物質の影響評価は、ISOで着目されている物理化学的パラメーターを総合的に考慮して行う必要があるが、既存の研究においては、粒径や形状といった一部のパラメーターに関する報告はなされているが、表面電荷や表面修飾といった他のパラメーターに着目した報告が少ないというのが実情である。そのため、現時点ではナノ物質の十分なリスク評価が行われていない。したがって、十分なリスク評価を行うために、報告が少ないパラメーターに着目して、それ

らの影響を解明することが望まれ、これらと既存の研究報告に基づき、影響評価を総合して考察する必要がある。

## 2. 研究の目的

ナノ粒子が肺胞上皮内にどれだけ取り込まれ、いかにヒトの健康に影響を及ぼすのか推算するために、本研究課題では、肺胞上皮に沈着したナノ粒子がどれだけ上皮内に取り込まれるのかを、ヒトII型肺胞上皮細胞(A549)と修飾基の異なる3種類の蛍光粒子を用いて、「表面修飾」、及び「表面電位」の違いに着目し、A549に取り込まれたナノ粒子を観察・定量することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ヒトII型肺胞上皮細胞の培養

A549細胞はDSファーマバイオメディカル社より購入し、培地は牛胎児血清(MP Biomedicals社製)10%、L-グルタミン液(DSファーマバイオメディカル社製)2mM、及びペニシリン100U/mL/ストレプトマイシン100µg/mL(Lonza社製)を含むD-MEM培地(DSファーマバイオメディカル社製)を用いた。培養には、35mm/Tissue Culture Dish(イワキ社製)の中に22mm×22mmスライドグラス(松浪社製)を入れたものを用いて、37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下で72時間培養(80%コンフルエント)を行った。継代のために細胞の培地をアスピレーターで取り除き、リン酸緩衝生理食塩水PBS(-)(タカラバイオ社製)で洗浄した後、0.02%エチレンジアミン四酢酸溶液(シグマアルドリッチジャパン社製)を1mL添加して5分間静置した。続いてエチレンジアミン四酢酸溶液をアスピレーターで取り除いた後、0.25%トリプシン溶液(MP Biomedicals社製)を1mL添加し、更に5分間静置した。その後、等量の培地を添加し、ピペッティングにより細胞を回収し、遠心分離を行った。上澄みをアスピレーターで慎重に取り除き、新たに培地10mLを加え、最後に、計数板を用いて細胞数を計数後、 $6.0 \times 10^4$ 個/mLの濃度となるように新たなディッシュに播種し、継代培養を行った。

### 共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察

72時間培養した細胞の培地をマイクロピペットで慎重に取り除き、PBS(-)で細胞を洗浄し、これに前節と同様の手法で作成した粒子懸濁液をそれぞれ1mL添加することで曝露をさせた。ディッシュからスライドグラスのみをピンセットで取り出し、曝露から0~30分後、1時間後、24時間後の細胞の天頂面から接着面までの画像を、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて取得することで、粒子の取り込みを観察した。粒子像は、出力35%の405nmレーザーにより励起され500~600nmの蛍光を検出するチャンネル1にて、また細胞の

輪郭は、透過光によるチャンネル2にて検出を行った。対物レンズの倍率は40倍で、デジタルズームを3.0倍として、画素数は512×512ピクセルであった。1.6秒ごとに対物レンズを0.55µm移動させ、細胞の天頂面から接着面までのスライス像を観察できるように設定した。曝露から0~30分後の観察は、3分間ごとにこれを繰り返すことで経時的に画像を取得し、1時間後の観察は曝露後、室温で静置させた細胞の画像を、24時間後の観察は予め72時間培養したものに粒子懸濁液を曝露させ、更に24時間培養させた細胞の画像を取得した。また、3種の粒子懸濁液のみの画像を取得することで、曝露させた各粒子の最適なコントラスト比を決定し、このコントラスト比においてそれぞれの画像を顕微鏡に付属しているソフトウェア(FLUOVIEW Ver. 3.1)にて編集した。

### 粒度分布と表面電位の計測

表面の修飾基が異なる3種の蛍光ナノ粒子Qdot® 565 ITK™ Carboxyl Quantum Dots、Qdot® 565 ITK™ Amino (PEG) Quantum Dots、Qtracker™ 565 non-targeted Quantum Dotsを、それぞれ個数濃度が $1.0 \times 10^{12}$ 個/mLとなるように、血清を含まないD-MEM培地に懸濁させた。この懸濁液の粒度分布、及びゼータ電位をELSZ-2 plusにて測定した。粒度分布測定は、セル(1cm角分光ガラスセル、大塚電子社製)を超純水で3回洗浄後、試料である粒子懸濁液0.5mLで共洗いをを行った。その後、試料を1.5mL添加して測定を行った。分析条件は、レーザー照射角度を165.0°、相関チャンネル数を440に設定し、溶媒は25.0℃の水に設定した。ゼータ電位測定は、セル(Flow Cell、大塚電子社製)を粒度分布測定と同様に、超純水で3回洗浄後、試料0.5mLで共洗いをを行った。分析条件は、レーザー照射角度を15.0°、サンプリング時間を400µ秒、相関チャンネル数を512、積算回数を5回に設定し、溶媒条件は25℃の水に設定した。

## 4. 研究成果

図1にそれぞれの粒子、時間におけるチャンネル1、及びチャンネル2を重ね合わせ、確認された細胞にA~S(図中の赤字)と名前をつけた画像を示す。各粒子とも曝露からの時間が経過するほど粒子の蛍光量は強くなっており、局所的な蛍光量の存在が確認された。細胞内部にも蛍光が確認されたが、スライス像から細胞内部よりも細胞膜上に多くの粒子が存在していた。

チャンネル1のみの画像におけるA~Sの細胞内部において、細胞の自家蛍光輝度以上の蛍光輝度を示したピクセルのカウント数を図2に示す。いずれの曝露群においても細胞によって取り込まれた粒子数が異なっており、細胞ごとの蛍光量に変動が大きかった。

各群間で粒子取り込み量の有意な変化が存在するかをノンパラメトリック法 (Wilcoxon 検定) により確認し、 $p$  値を算出した (有意水準は 0.05)。

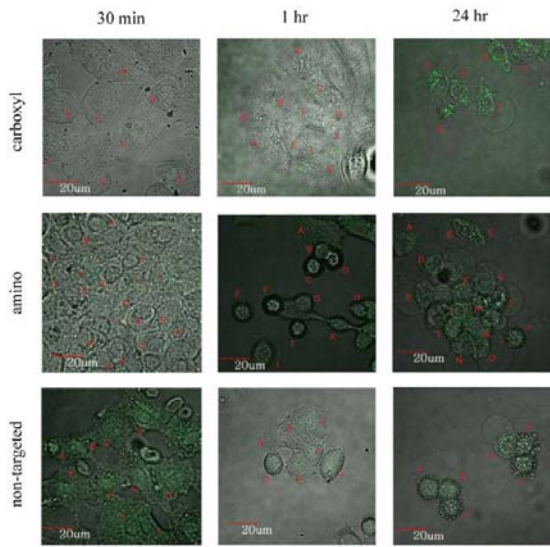


図 1 A549 細胞に粒子懸濁液を曝露させた後の細胞像

(上段:カルボキシル修飾、中段:アミノ修飾、下段:修飾基なし、左列:曝露から 30 分後、中列:曝露から 1 時間後、右列:曝露から 24 時間後)

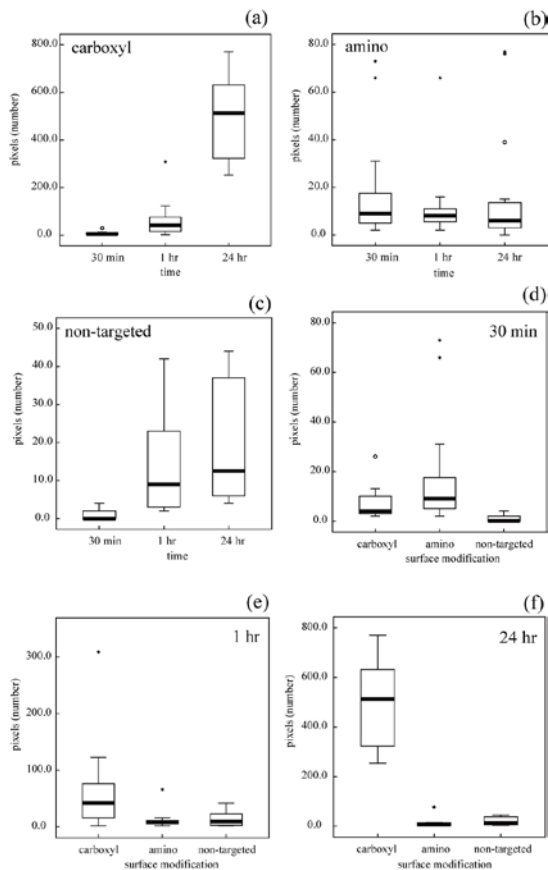


図 2 自家蛍光輝度より大きな輝度を示したピクセルのカウント数

(a):カルボキシル修飾、(b):アミノ修飾、(c):無修飾、(d):曝露から 30 分後、(e):曝露から 1 時間後、(f):曝露から 24 時間後)

このことから、カルボキシル修飾、及び無修飾粒子においては、曝露時間が経過するほど取り込み量が多くなることが確認され、アミノ修飾では、曝露時間による取り込み量の増加が認められなかった。また、曝露から 30 分後以外では、カルボキシル修飾の粒子が他の粒子より圧倒的に多く細胞内に取り込まれ、アミノ修飾、無修飾粒子間には大きな違いは見られなかった。曝露から 30 分後では、カルボキシル修飾、及びアミノ修飾が無修飾粒子よりも多く取り込まれた。曝露から 30 分間以内に取り込みがあったと考えられるカルボキシル修飾、及びアミノ修飾においては、曝露から 21 分後には粒子の取り込みが始まることも確認できた。

粒子の表面修飾の違いにおける取り込み量については、ヒト T 細胞の一種である Jurkat 細胞やラット副腎髄質由来の褐色細胞腫 PC12 などを用いた既存の研究<sup>1-3)</sup>において、カルボキシル修飾、アミノ修飾、無修飾の順で多く取り込まれ、カルボキシル修飾が他に比べ、圧倒的に多く取り込まれると報告されている。本課題で用いたヒト II 型肺胞上皮細胞においても同様の傾向が見られ、細胞種の違いによる粒子の取り込み量に差は無いことが確認できた。粒子表面電位の違いにおける取り込み量については、ゼータ電位の測定結果から、粒子表面が負電荷に帯電しているほど取り込まれやすいという可能性が示唆された。細胞膜の表面には高分子から成る糖鎖やタンパク質が存在し、これらが解離して細胞表面は負に帯電しており、負に帯電した粒子と細胞表面との間には静電気力による斥力が働く。同符号に帯電しているほど取り込み量が多くなるのであれば、それを上回る何らかの引力が働いていると考えられる。秋山らは、電界質水溶液を想定した水溶液中に、溶媒分子の 6 倍の大きさを有する、負電荷に帯電したマクロイオンを浸し、溶液の電解質濃度を  $10^{-6}$ ~ $1$  M まで変化させることで、マクロイオン間に働く実効引力を算出した。その結果、マクロイオンが負に帯電しているほど実効引力が強く働き、また  $10^{-3}$  M オーダーにおいては電解質濃度の上昇とともにマクロイオン間の静電気力による斥力がカチオンにより遮蔽され、実効引力が大きくなるが、 $10^{-3}$  M 以上になると徐々に実効引力が消失することを報告している<sup>4)</sup>。このことから、電解質溶液である培地中において、細胞膜表面に存在するタンパク質等の負に帯電した分子と、曝露させたナノ粒子の間に

静電気力による斥力を上回る引力が働いており、この引力が、負に帯電しているカルボキシル修飾において最も強くなっていることが考えられる。このように粒子と細胞との間に働く力としては、溶媒の電解質濃度に依存して、負に帯電している粒子ほど細胞に接着しやすいことが明らかとなった。

#### 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1件)

1) Matsui Y., Sakai N., Tsuda A. and Yoneda M. (2011) Relationship between Surface Modifications of Nanoparticle and Invasion into Suspension Cells. J. Phys.: Conf. Ser. 304, 012051 (査読有)

[学会発表] (計3件)

① K. Nishioka, Y. Matsui, M. Yoneda: Quantum cellular uptake of nano-sized particles depending on physicochemical characters, American Thoracic Society 2012, San Francisco, USA

② Y. Matsui, N. Sakai, M. Yoneda, A. Tsuda: Sensory Nerves around Pulmonary Alveoli in Mice and Translocation of Nanoparticles to Neuronal Cells, American Thoracic Society 2011, Denver, USA

③ N. Sakai, Y. Matsui, M. Yoneda, A. Tsuda: Synchrotron Micro-CT Imaging Of Olfactory Bulb In Rats Exposed Gold Nanoparticles By Inhalation, American Thoracic Society 2011, Denver, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松井 康人 (YASUTO MATSUI)

京都大学・工学研究科・講師

研究者番号：50533501