

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550112

研究課題名(和文) ナノ粒子の細胞内取り込み挙動解析を可能とする単一ナノ粒子計測システムの開発

研究課題名(英文) Development of single nanoparticle measurement system for analysis of uptake behavior of nanoparticles in biological cells

研究代表者

稲垣 和三 (INAGAKI, KAZUMI)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・研究室長

研究者番号：50356490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：金属含有ナノ粒子の細胞内取り込み及び溶解性評価を可能とする計測システムとして、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いた単一ナノ粒子計測システムを開発した。本研究では、ICP-MSによる高時間分解計測(時間分解能<10 us)を可能とする検出システムを構築し、効率的なデータ処理手法を確立した。さらに、細胞直接導入インターフェースを改良し、適用細胞サイズを拡大した。本研究で開発したシステムを用い、微生物細胞への金属含有ナノ粒子曝露実験による各粒子の細胞内取り込み挙動解析および溶解性評価を実施することで、システムの有効性を実証した。

研究成果の概要(英文)：A single nanoparticle measurement system using ICP-MS was developed for analysis of uptake and dissolution behavior of nanoparticles in biological cells. In this study, a high speed detection system that can measure with time resolution less than 10 us was built in ICP-MS instrument, and an effective data processing scheme was established. Furthermore, direct cell introduction system was modified for extending a capability for introducing a large cells. For checking the performance of the system, the system developed was applied for evaluating uptake and dissolution behavior of nanoparticles in microalgal cells.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノ粒子 細胞 質量分析

1. 研究開始当初の背景

クリントン政権におけるアメリカ合衆国の“国家ナノテクノロジー戦略”以来、我が国でも機能性ナノ粒子の産業及び医療への応用が盛んに展開されている。ナノ粒子は、量子サイズ効果、体積効果等による新たな特性発現と同時に、細胞内侵入及び溶解による生体毒性発現の危険性も併せ持っており、機能性材料として用いるには“機能性追求”と“リスク管理のための生体影響評価”を同時進行させる必要がある。生体影響評価では、培養細胞を用いた曝露試験が行われているが、そこで重要となる細胞内取り込み挙動解析および毒性発現に大きく影響する溶解性評価のための計測手法はいまだ模索状態なのが現状である。

2. 研究の目的

我が国における産業及び医療分野における機能性ナノ粒子の開発競争力強化に資する計測システムとして、金属含有ナノ粒子の細胞内取り込み及び溶解性評価を可能とする単一ナノ粒子計測システムを新規開発することを目的とした。

具体的には、高感度元素選択的な計測が可能な誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)の試料導入部と装置検出部を改良し、プラズマ内に粒子および細胞を高効率に導入可能とするとともに、プラズマ内でイオン化した粒子および細胞を高時間分解計測することで単一粒子ないし細胞を高感度に検出するシステムの開発を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、ICP-MSを用いた単一ナノ粒子計測システムを構築するため、高時間分解計測(時間分解能 $<10\ \mu\text{s}$)を可能とする検出システムの構築とデータ処理手法の確立、細胞直接導入インターフェースの大幅改良による適用細胞サイズの拡大、について同時並行で検討した。さらに、本システムの応用として、微生物細胞への金属含有ナノ粒子曝露実験による各粒子の細胞内取り込み挙動解析および溶解性評価を実施した。

に関しては、装置メーカー協力のもと、ICP-MS装置検出器からの直接信号読み取りシステムの構築を試みた。さらに、システムで得られる膨大なデータの効率的な処理手法についても併せて検討した。

に関しては、既開発の細胞直接導入インターフェースのネプライザー構造および気化室形状の改良により、プラズマへの粒子および細胞導入効率を大幅に向上させることを試みた。

に関しては、強酸性条件で生育する微生物である紅藻 *Galdieria sulphuraria* をモデル細胞にして実験を行った。

4. 研究成果

(1) 高時間分解計測を可能とする検出システ

ムの構築とデータ処理手法の確立

ナノ粒子のプラズマ内分解時間は $200\ \mu\text{s}$ から $400\ \mu\text{s}$ である。従って、単一ナノ粒子から分解生成したイオンを検出するには、少なくとも時間分解 $50\ \mu\text{s}$ - $100\ \mu\text{s}$ での計測を可能とする必要がある。本研究では、ファンクションジェネレーターを介して装置検出器からパルスカウンティングする高時間分解計測システムを構築し、最終的に時間分解能 $<10\ \mu\text{s}$ での計測が連続1時間以上可能で、単一粒子に起因するイベントの面積演算を自動処理可能なシステムを構築することができた。図1に粒子径 $60\ \text{nm}$ の金粒子標準物質(NIST RM8013)の時間分解計測プロファイルを、図2にそこから得られる粒度分布測定結果例を示す。粒度分布プロファイルは、標準物質に付随する参考情報(TEM等による測定結果)とよく一致しており、本システムの妥当性を確認することができた。

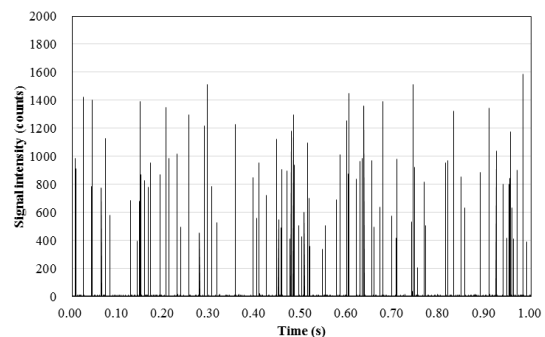


図1 開発したシステムで得られた金ナノ粒子分散液の高時間分解計測プロファイル(時間分解能 $50\ \mu\text{s}$)

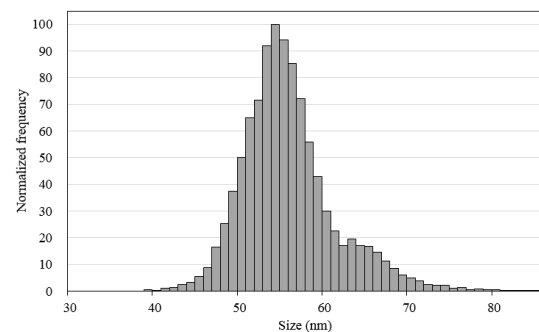


図2 高時間分解計測プロファイルから算出した分散液中金ナノ粒子の粒度分布

開発した計測システムにおいて、粒径分布計測を正確に行うために、同一計測時間に複数の粒子・細胞が検出されない条件を満たす粒子導入数限界を検討した結果、1秒当たり300個未満の粒子・細胞導入であれば、同一計測時間に複数の粒子・細胞が検出される確率が1%以下になることが確認できた。

(3) 細胞直接導入インターフェースの大幅改良による適用細胞サイズの拡大

既開発の細胞直接導入インターフェースでは、噴霧液滴の平均粒径 (< 3 μm) と同程度の大きさの細胞のプラズマへの導入効率は 30 % 程度しか得られていなかった。本研究では、3重管構造ネブライザーの中心管径およびノズル形状を変更し、気化室にシースガス導入部を設けることで細胞のプラズマへの導入効率の改善を図った結果、平均粒径 3 μm の微生物細胞では、ほぼ 100 % の導入効率を達成することができた。また、平均粒径 6.4 μm の微生物細胞でも、導入効率約 80 % を達成することができた (図 3)。

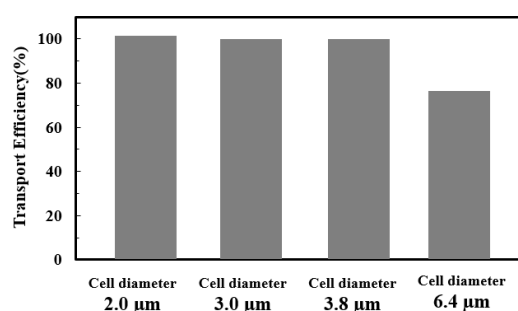


図 3 改良型細胞直接導入インターフェースを用いた際のプラズマへの細胞導入効率

(3) 微生物細胞への金属含有ナノ粒子曝露実験による各粒子の細胞内取り込み挙動解析および溶解性評価

本研究で開発した計測システムの応用例として、強酸性条件で生育する微生物である紅藻 *Galdieria sulphuraria* を用いたモデル実験を実施した。酸化鉄、酸化ジルコニウム、白金および金のナノ粒子 (粒子径 100 nm 以下) を 24 時間曝露した状態で培養した紅藻と、同金属元素の溶液を同様に曝露した紅藻を分析し、紅藻への各粒子の取り込み挙動を評価した。元素ごとに特徴的な分析結果が得られ、粒子組成によって異なる取り込みあるいは細胞表面吸着挙動を示す結果であった。現在、測定結果の検証のため、走査型電子顕微鏡による粒子の取り込みもしくは表面吸着状態の直接観察評価を並行して進めている。

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)

稲垣 和三、藤井 紳一郎、宮下 振一、長澤 圭祐、岡橋 哲也、A. S. Groombridge、高津 章子、千葉 光一、A Novel Concentric Grid

Nebulizer for Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 29, 2014, 2136-2145.

DOI: 10.1039/C4JA00233D

宮下 振一、A. S. Groombridge、藤井 紳一郎、袁田 歩、高津 章子、日置 昭治、千葉 光一、稲垣 和三、Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively-coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 29, 2014, 1598-1606.

DOI: 10.1039/C4JA00040D

宮下 振一、A. S. Groombridge、藤井 紳一郎、高津 章子、千葉 光一、稲垣 和三、Time-resolved ICP-MS Measurement: a New Method for Elemental and Multiparametric Analysis of Single Cells, *Anal. Sci.*, 査読有, 30, 2014, 219-224.

DOI: 10.2116/analsci.30.219

A. S. Groombridge、稲垣 和三、宮下 振一、藤井 紳一郎、大畑 昌輝、長澤 圭祐、岡橋 哲也、梅村 知也、高津 章子、千葉 光一、High Sensitive Elemental Analysis of Single Yeast Cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by Time-Resolved Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry using a High Efficiency Cell Introduction System, *Anal. Sci.*, 査読有, 29, 2013, 597-603.

DOI: 10.2116/analsci.29.597

[学会発表](計 10 件)

宮下 振一、A. S. Groombridge、藤井 紳一郎、袁田 歩、高津 章子、日置 昭治、稲垣 和三、千葉 光一、Improvement of cell measurement efficiency in single-cell analysis by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry, 2014 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 2014 年 1 月 9 日、Florida, USA.

稲垣 和三、藤井 紳一郎、宮下 振一、高津 章子、千葉 光一、Development of Novel Concentric Type Grid Nebulizer for Plasma Spectrometry, 2014 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 2014 年 1 月 9 日、Florida, USA.

稲垣 和三、宮下 振一、A. S. GROOMBRIDGE、藤井 紳一郎、長澤 圭祐、岡橋 哲也、高津 章子、千葉 光一、High sensitive elemental analysis of single yeast cells by time-resolved inductively-coupled plasma mass spectrometry using a high efficiency cell introduction system, 2013 年 11 月 19 日、ISTERH2013, 東京.

宮下 振一、A. S. Groombridge、藤井 紳一

郎、高津 章子、日置 昭治、稲垣 和三、千葉 光一、細胞直接導入/ICP 質量分析法における細胞導入効率の改善、2013年9月10日、日本分析化学会第62年会、近畿大学

稲垣 和三、High sensitive elemental analysis of single microbial cells by time-resolved inductively-coupled plasma mass spectrometry, International Franco-Japanese Workshop on Metallomics, 2013年7月5日、France, Pau(招待講演)

宮下 振一、時間分解 ICP-MS による微生物の単一細胞分析、第87回プラズマ分光分析研究会、2013年3月8日、東京工業大学。(依頼講演)

稲垣 和三、High Performance Triple Tube Concentric Nebulizer for Plasma Spectrometry、2013 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry、2013年2月12日、Krakow, Poland (招待講演)。

宮下 振一、A. S. Groombridge、稲垣 和三、藤井 紳一郎、高津 章子、日置 昭治、千葉 光一、時間分析 ICP-MS による微生物細胞内微量元素の半定量分析、日本分析化学会第61年会、2012年9月21日、金沢大学。

藤井 紳一郎、A.S. Groombridge、稲垣 和三、宮下 振一、高津 章子、日置 昭治、千葉 光一、高効率細胞導入システムと時間分解 ICP-MS による単一酵母細胞中の微量元素分析、第3回メタロミクス研究フォーラム、2012年8月30日、昭和薬科大学。

宮下 振一、A. S. Groombridge、稲垣 和三、藤井 紳一郎、高津 章子、日置 昭治、千葉 光一、時間分解 ICP-MS による微生物細胞内微量元素の半定量分析、第3回メタロミクス研究フォーラム、2012年8月30日、昭和薬科大学。

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 和三 (INAGAKI KAZUMI)
独立行政法人産業技術総合研究所/
計測標準研究部門 研究室長
研究者番号：50356490

(2)研究分担者

高津 章子 (TAKATSU AKIKO)
独立行政法人産業技術総合研究所/
計測標準研究部門 研究科長
研究者番号：10357361

藤井 紳一郎 (FUJII SHIN-ICHIROU)
独立行政法人産業技術総合研究所/
計測標準研究部門 主任研究員
研究者番号：10415739

宮下 振一 (MIYASHITA SHIN-ICHI)
独立行政法人産業技術総合研究所/
計測標準研究部門 研究員
研究者番号：60614766

(3)連携研究者

加藤 晴久 (KATO HARUHISA)
独立行政法人産業技術総合研究所/
計測標準研究部門 主任研究員
研究者番号：10462839