

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289276

研究課題名(和文) ナノ粒子・生体膜間相互作用のメカニズム解明とマルチスケールシミュレーション

研究課題名(英文) Interactions between nanoparticles and biological membranes: Mechanism elucidation and multiscale simulation

研究代表者

新戸 浩幸 (Hiroyuki, Shinto)

福岡大学・工学部・教授

研究者番号：80324656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ナノメートルサイズのシリカ粒子が、生体膜とモデル生体膜に及ぼす影響について検討した。溶血試験によって、シリカ粒子による赤血球膜の損傷は、粒子の曝露濃度・曝露時間の他に、粒子径と等張溶液の構成成分にも影響されることがわかった。LB膜作成装置から得られる表面圧-面積の曲線によれば、リン脂質単分子膜(モデル生体膜)に対して、シリカ粒子は引力的な相互作用をすると考えられる。シリカ粒子が生体膜に強く付着すると考えられる相手として、膜タンパク、リン脂質、これらに糖鎖が結合したものなどが考えられるが、特定するためにはさらに詳細な実験的検討が必要不可欠である。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the impacts of nanometer-sized silica particles on the biological membranes and the model membranes. The hemolysis assays revealed that the membrane damage of red blood cells by silica particles is affected not only by the particle concentration and the incubation time, but by the particle size and the ingredients of isotonic solution media. The pressure-area curves obtained from a Langmuir instrument implied that the silica particles attractively interact with a monolayer of phospholipids (i.e., a model membrane). The targets in biological membranes for adsorption of silica particles would include membrane proteins, phospholipids, and carbohydrate chains binding to them; nevertheless, the more detailed experimental studies are required to draw the final conclusion.

研究分野：界面プロセス工学

キーワード：ナノリスク ナノ粒子 生体膜 ソフト界面 コロイド

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。このようなナノ粒子は、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。

筆者らは、培養細胞を用いて、性状の大きく異なる動物細胞（赤血球、浮遊性細胞、附着性細胞）に対するナノ粒子の毒性・膜損傷性を系統的に検討している。一方、巨大ベシクル（モデル生体膜の一つ）へのナノ粒子の附着に関する研究が報告されているが、生理的な塩濃度条件下での粒子曝露行われていないため、実際の生体膜で見られる現象との対応はよくわかっていない。さらに、ナノ粒子・生体膜間の相互作用の計算機シミュレーションも数多くなされているが、単に現象を再現するように条件設定がなされている研究報告が多い。

2. 研究の目的

本研究では、「最も単純な生体膜と考えられる赤血球膜」と「リン脂質のみで構成されるモデル生体膜」に注目し、ナノ粒子の毒性・膜損傷性について、実際の生体膜とモデル生体膜との類似点・相違点を明らかにし、ナノ粒子・生体膜間相互作用のメカニズムの全体像を物理化学的に理解することを目指す。さらに、分子モデリングと流体マイクロモデリングとを連携させたマルチスケールシミュレーションを実行し、実験結果の検証および当該現象の予測手法を構築する。これにより、ナノリスクが問題視されている産業・社会へ貢献する。

3. 研究の方法

ナノ粒子・生体膜間相互作用のメカニズムの全体像を物理化学的に理解し、さらにその予測手法を構築するため、以下の項目について研究を実施する。

- (1) ナノ粒子の赤血球膜への附着と膜損傷の評価・観測
- (2) ナノ粒子のモデル生体膜への附着と膜損傷の評価・観測
- (3) ナノ粒子・生体膜間相互作用のマルチスケールシミュレーション

上記(1)・(2)では、各種顕微鏡法（光学顕微鏡、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡）などを駆使して、単一細胞・単一粒子レベルの計測を行う。上記(3)では、筆者が有する分子モデリングと流体マイクロモデリングの経験を最

大限に生かして、マルチスケールシミュレーションを行う。

4. 研究成果

(1) 現在大量に使用されているシリカ粒子について、赤血球の膜損傷に及ぼす粒子径(5 ~ 120 nm) および分散媒体である等張溶液(150 mM 塩化ナトリウム水溶液、300 mM グルコース水溶液、両者の任意混合水溶液)の影響を調べることにより、以下のようなことを明らかにした。

大きさ 11 ~ 120 nm のシリカ粒子による膜破壊は、リン酸緩衝溶液(DPBS; pH=7.4, 電解質濃度は 150 mM NaCl 相当)中では、粒子の大きさではなく、溶液体積当たりの粒子の表面積に依存した。シリカ粒子が生体膜表面に強く附着するため、膜が変形・破壊されると考えられる。

大きさ 8 nm のシリカ粒子は最大の膜破壊性を示し、生体膜の厚さと同じ 5 nm の大きさのシリカ粒子では膜破壊性が著しく低下した。5 nm のシリカ粒子は、生体膜の厚さ 5 nm とほぼ同じであるため、膜を損傷させることが難しいと考えられる。塩化ナトリウム濃度が低下するにつれて、濃度 150 mM 25 mM では膜破壊性が低下するが、濃度 25 mM 0 mM では膜破壊性が上昇した。本条件ではシリカ粒子と赤血球の表面はともに負帯電していることを鑑みて、前者と後者の結果を考える。前者は、塩化ナトリウム濃度が低下するにつれて、シリカ粒子 - 赤血球間に働く電気二重層斥力の作用距離と強度がより大きくなり(DLVO 理論)、シリカ粒子と赤血球が互いに接近しにくくなったためと考えられる。しかし、後者の結果は、このような DLVO 理論では説明できない。

このように、シリカ粒子の赤血球膜への附着と膜損傷のメカニズムの全体像を明らかにした。

(2) モデル生体膜として、研究開始当初は「リン脂質被覆 W/O エマルション」および「巨大ベシクル」を用いていた。しかし、これらのサンプル調製は、バッチ毎にばらつきが大きく、本研究の評価系で用いるには極めて効率が悪かった。このため、LB 膜作製装置によって「水面上に形成される不溶性単分子膜」を用いることにした。この不溶性単分子膜と水相に懸濁されたナノ粒子との相互作用を、表面圧 - 面積の曲線(-A 曲線)から調べた。

純水中に懸濁されたシリカ粒子(大きさ 8 nm)と不溶性単分子膜($C_nH_{2n+1}-R$)の相互作用は、親水基の種類($R = -COOH, -OH, -NH_2$)と炭素鎖の長さ($n = 13, 14, 18$)に影響された。

水面上に形成されるリン脂質(DPPC)の単分子膜と水相(Tris-HCl 緩衝液 150 mM, pH=7.4)に懸濁されたシリカ粒子(大きさ 8 nm)または 12 タングストケイ酸(大

きさ約 1 nm) との相互作用を調べた。シリカ粒子の場合、粒子懸濁液の濃度が濃くなるほど、より高い圧力を示した。12 タングストケイ酸の場合、粒子懸濁液の濃度が低いときは粒子なしの場合と同じような -A 曲線を示し、粒子懸濁液の濃度が 10 mg/mL のとき、やや強い圧力を示した。すなわち、シリカ粒子は、12 タングストケイ酸よりも強く、モデル生体膜と相互作用していると考えられる。このような挙動は、赤血球を用いた溶血試験でも見られた。

このように、シリカ粒子はリン脂質単分子膜と引力的な相互作用ををすると思われる。しかし、シリカ粒子懸濁液に含まれている微量な不純物が -A 曲線に影響を及ぼしている可能性も否定できないため、今後も慎重な検討が必要不可欠である。

(3) 上記(1)(2)の結果および文献調査の結果、シリカ粒子が生体膜に強く付着すると考えられる相手として、膜タンパク、リン脂質、これらに糖鎖が結合したものなどが考えられる。しかし、特定するためには、さらに詳細な実験的検討が必要不可欠である。このため、ナノ粒子・生体膜間相互作用のマルチスケールシミュレーションについては、計算プログラムを開発するだけに留めた。現状では、単に現象を再現するように、シミュレーションの条件設定をせざるを得ないためである。

以上のように、シリカ粒子の赤血球膜への付着と膜損傷のメカニズムの全体像を明らかにしたが、まだ不明な点も残っている。

このため今後の研究では、比較的少量のサンプル量でも細胞や粒子状物質を一つ一つ解析可能なフローサイトメータを導入し、赤血球と巨大ベシクルに対するシリカナノ粒子の影響を詳細に検討したい。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のち、ナノ粒子・生体膜間相互作用のマルチスケールシミュレーションを実行したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

H. Shinto, T. Fukasawa, K. Yoshisue, M. Tezuka, M. Orita, “Cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, malignant melanocytes, and macrophages”, *Advanced Powder Technology*, 25, 2014, 1872-1881, 査読有
DOI:10.1016/j.appt.2014.09.002

H. Ichikawa, T. Uneme, T. Andoh, Y. Arita, T. Fujimoto, M. Suzuki, Y.

Sakurai, H. Shinto, T. Fukasawa, F. Fujii, Y. Fukumori, “Gadolinium-loaded chitosan nanoparticles for neutron-capture therapy: Influence of micrometric properties of the nanoparticles on tumor-killing effect”, *Applied Radiation and Isotopes*, 88, 2014, 109-113, 査読有
DOI:10.1016/j.paradiso.2013.12.018

新戸浩幸, “混相流における毛管架橋力の重要性”, *混相流*, 28, 2014, 458-465, 査読無
DOI:10.1016/j.paradiso.2013.12.018

新戸浩幸, “分子動力学シミュレーション”, *色材協会誌*, 86, 2013, 380-385, 査読有
http://www.shikizai.org/Journal/backnumber/vol86/10/380_385.pdf

〔学会発表〕(計 16 件)

塚本七海, 有田拓哉, 廣橋由美子, 瀬戸弘一, 新戸浩幸, “大食細胞へのマイクロ粒子の付着・取込に及ぼす粒子表面物性の影響”, *粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム*, 2016 年 8 月 9 日, 神戸

新戸浩幸, 織田真由美, 深澤智典, “コロイドプローブ AFM を用いた動物細胞・材料間の接着力の直接測定”, *粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム*, 2016 年 8 月 9 日, 神戸

塚本七海, 有田拓哉, 廣橋由美子, 新戸浩幸, “大食細胞へのマイクロファイアの取り込み”, 第 18 回化学工学会学生発表会(福岡大会), 2016 年 3 月 5 日, 福岡大学

H. Shinto, T. Fukasawa, K. Yoshisue, M. Tezuka, M. Orita, “Cell Membrane Disruption Induced by Amorphous Silica Nanoparticles in Different Types of Mammalian Cells”, *Western Pacific Colloids 2015*, 2015 年 11 月 17 日, Siem Reap, Cambodia

新戸浩幸, 織田真由美, 深澤智典, “細胞・材料間の接着力の AFM 測定”, *成形加工シンポジウム'15*, 2015 年 11 月 3 日, 福岡大学

新戸浩幸, 深澤智典, 吉末幸祐, 吉末幸祐, 織田真由美 “Cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, malignant melanocytes,

and macrophages”, 粉体工学会 2015 年度 秋期研究発表会, 2015 年 10 月 13 日, 大阪

新戸浩幸, “生体ソフト界面現象 ~実在系とモデル系の類似点・相違点~”, 第 66 回コロイドおよび界面化学討論会, 2015 年 9 月 11 日, 鹿児島大学

新戸浩幸, “コロイド・界面から生体ソフト界面への展開”, 第 23 回 LBM 研究会, 2015 年 6 月 12 日, 福岡大学

新戸浩幸, “界面と表面力の重要性 ~混相流と細胞を中心に~”, 化学工学会 粒子・流体プロセス部会 ミキシング技術分科会 第 19 回九州地区ミキシング技術サロン, 2014 年 12 月 22 日, 福岡大学

新戸浩幸, 織田真由美, 深澤智典, “生体材料の表面改質とその細胞接着性の直接 AFM 測定”, 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014 年 9 月 16 日, 九州大学 伊都キャンパス

H. Shinto, T. Fukasawa, K. Yoshisue, M. Tezuka, M. Orita, “Cell Membrane Disruption Induced by Silica Nanoparticles in Different Types of Mammalian Cells”, 第 65 回コロイドおよび界面化学討論会, 2014 年 9 月 4 日, 東京理科大学 神楽坂キャンパス

新戸浩幸, 織田真由美, 深澤智典, “生体材料の表面改質とその細胞接着性のコロイドプローブ AFM 測定”, 第 65 回コロイドおよび界面化学討論会, 2014 年 9 月 3 日, 東京理科大学 神楽坂キャンパス

深澤智典, 新戸浩幸, “材料の生体影響が AFM 測定でわかる!?”, APPIE 産学官連携フェア 2013 - 粉の技術 -, 2013 年 10 月 10 日, アジア太平洋トレードセンター

長田 翔, 手塚幹人, 深渡瀬 健, 新戸浩幸, “ヤヌス粒子に被覆された液滴のせん断流による変形挙動”, 第 64 回コロイドおよび界面化学討論会, 2013 年 9 月 19 日, 名古屋工業大学

吉末幸祐, 深澤智典, 新戸浩幸, “シリカ粒子による動物細胞の膜破壊の普遍性”, 化学工学会第 45 回秋季大会, 2013 年 9 月 17 日, 岡山大学 津島キャンパス

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, 同志社大学 京田辺キャン

パス

〔図書〕(計 3 件)

N. Ishida, Y. Kusaka, T. Fukasawa, H. Shinto, “Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science”, Wiley, 2016, Chapter 4

新戸浩幸, “エマルションの特性評価と新製品開発、品質管理への活用”, 技術情報協会, 2014, 246-251

新戸浩幸, “粉体工学ハンドブック”, 朝倉書店, 2014, 302-303

〔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

新戸 浩幸 (SHINTO, Hiroyuki)
福岡大学・工学部・教授
研究者番号: 8 0 3 2 4 6 5 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

深澤 智典 (FUKASAWA, Tomonori)
広島大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 0 0 5 8 9 1 8 7

(4) 研究協力者

織田 真由美 (ORITA, Mayumi)
廣橋 由美子 (HIROHASHI, Yumiko)
東 将大 (HIGASHI, Masahiro)
久保 幸毅 (KUBO, Koki)
有村 昌幸 (ARIMURA, Masayuki)
赤瀬 祥太 (AKASE, Syota)
上尾 優里 (UEO, Yuri)
塚本 七海 (TSUKAMOTO, Nanami)
有田 拓哉 (ARITA, Takuya)