

課題番号 : F-12-KT-0007  
 支援課題名 (日本語) : ナノ粒子表面状態と細胞との相互作用に関する研究  
 Program Title (in English) : Interactions between cell membrane and nanoparticle  
 利用者名 (日本語) : 松井 康人  
 Username (in English) : Yasuto Matsui  
 所属名 (日本語) : 京都大学大学院工学研究科  
 Affiliation (in English) : Graduate School of Engineering

※概要 (Summary) :

本研究では、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、表面修飾が関与する可能性が高いことが示唆された。

※実験 (Experimental) :

- ・共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000-D)

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 1 mL 添加することで曝露をさせた。ディッシュからスライドガ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。

- ・粒度分布測定器 (ELSZ-2 plus)

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。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

図 1 に粒子懸濁液の粒度分布を示す。各粒子ともピーク粒径が 20 nm 前後であり、D-MEM 中では凝集はしていなかった。

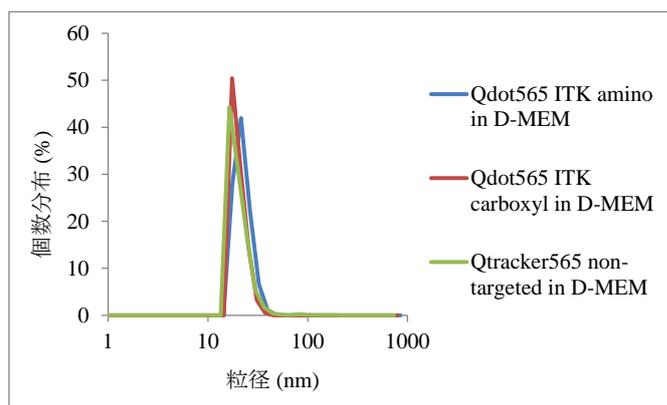


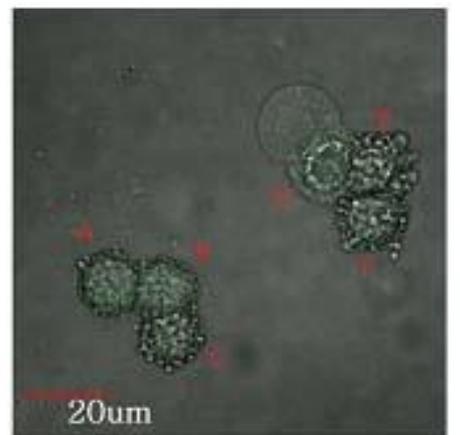
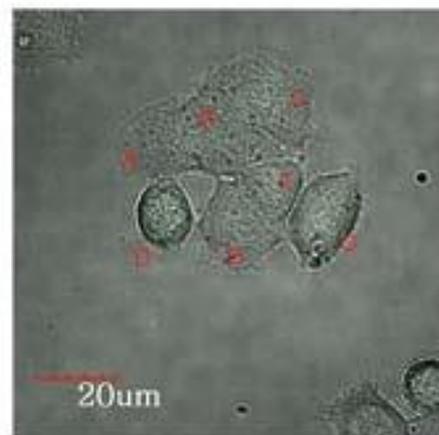
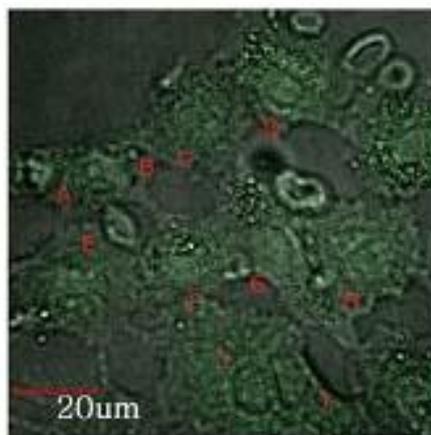
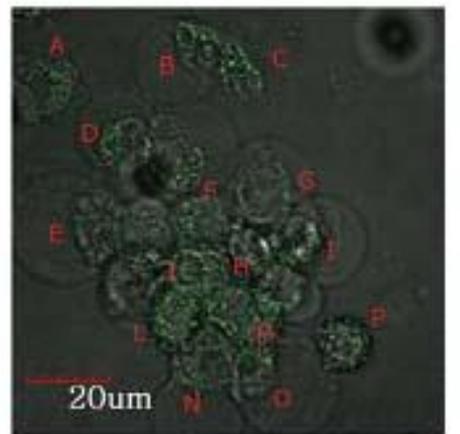
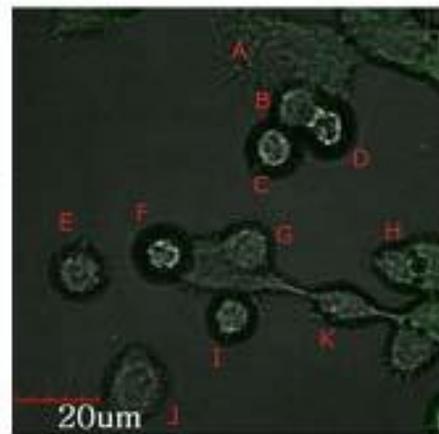
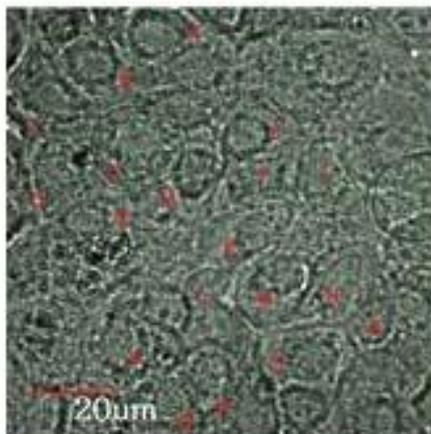
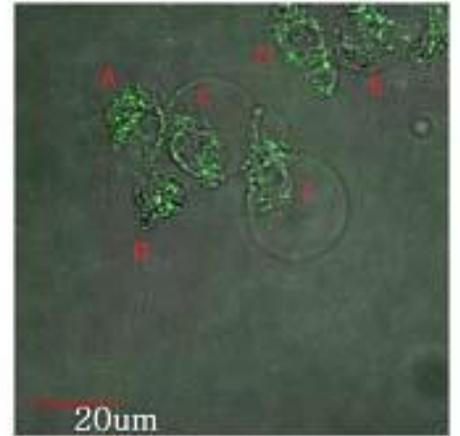
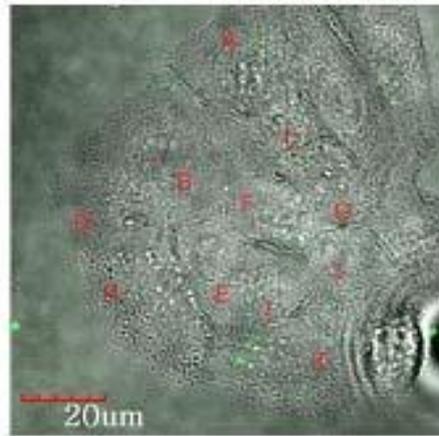
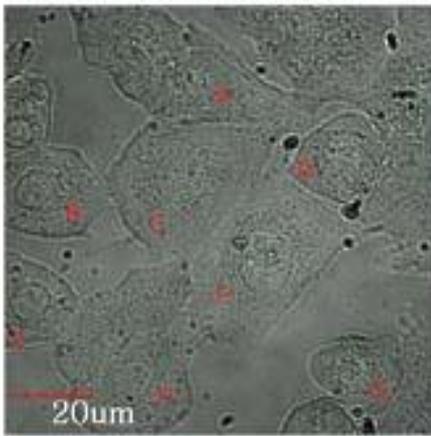
図 1 各粒子懸濁液の粒度分布

表 1 に各懸濁液中の粒子のゼータ電位を示す。どの粒子表面も負に帯電しており、カルボキシル修飾のゼータ電位が一番大きく -13.1 mV、アミノ修飾が -1.36 mV、無修飾が -0.46 mV であった。

表 1 懸濁液中の各粒子のゼータ電位

投与した懸濁液中 ゼータ電位 (mV)	
carboxyl	-13.1
amino	-1.36
non-targeted	-0.46

図 2 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 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、局所的な存在が確認された。細胞内部にも蛍光が確認されたが、細胞内部よりも細胞膜上に多くの粒子が存在していた。



※その他・特記事項 (Others) :

・今後の課題

細胞のナノ粒子取り込みについては、細胞膜表面に粒子が結合してエンドサイトーシスにより取り込まれる過程で、粒子の表面修飾が選択的な取り込みに関与していると考えられた。しかし、その機構については解明されておらず、この機構を解明することが、ナノ粒子のリスク評価をする上で重要なパラメーターになるのではないかと考える。

共同研究者等 (Coauthor) :

米田 稔 (工学研究科・教授)、小山 陽介 (工学研究科・大学院生)、西岡 和久 (工学研究科・大学院生)  
論文・学会発表

(Publication/Presentation) :

American Thoracic Society 2012, Y. Matsui, K. Nishioka, Quantitative Analysis about Cellular Uptake of Nanoparticles Depending on Physiochemical Characters (Oral Presentation)

関連特許 (Patent) :

なし