学位論文題名

In situ observation of dynamic response behavior of cells exposed to micro/nano particles by time lapse observation

(微粒子曝露下の細胞の動的応答挙動のその場観察と刺激性評価)

学位論文内容の要旨

【目的】 歯科臨床では日常的に患者や術者が歯科材料の切削・摩耗粉に曝露されている。また、薬品・化粧品の分野でもマイクロ・ナノサイズの粒子が広範囲に使用されており、それらの一部は体内へと取り込まれる可能性がある。従来、微粒子曝露時の形態観察と細胞毒性評価は細胞固定後、静的状態でなされてきた。しかし、細胞より小さいナノ粒子では細胞への相互作用を誘導するため、生きた状態での細胞挙動を観察することが必要である。本研究ではタイムラプス法を用い動的挙動の観察を行い、生きた状態でのナノ粒子に対する細胞活動と機能性を観察することを目的とした。

【材料と方法】 1) 微粒子：ナノ・マイクロサイズの酸化チタン (TiO_2)、酸化銅 (CuO)、白金 (Pt)、酸化インジウムスズ (ITO: Indium-Tin Oxide) を用いた。それらの粒子サイズは SEM 観察と動的光散乱法 (DLS) により評価した。また、溶出 Cu イオンによる影響を調べるため Cu イオン溶液を作成した。CuO 粒子を培養液中に高濃度で分散させ、48 時間後にろ過を行い、得られた溶液中の Cu 濃度を誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP) を用いて測定した。2) タイムラプス法連続観察：マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1：以下 E1) を培養し、35-mm glass-bottom dishes に細胞 1×10^4 個を播種した。定着後 PBS に分散させた微粒子を最終濃度 10ppm になるように、培養液中に添加した (Cu イオンについては 30ppm、50ppm)。なお、添加なしをコントロールとした。その後、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下のステージ上で 24 時間、3 分毎にタイムラプス法により細胞の挙動を撮影した (北海道大学・ニコンイメージングセンター)。

3) 細胞毒性試験：E1 を 24Well Cell Culture Cluster に細胞 1×10^4 個を播種・培養した。定着後、PBS に分散させた微粒子を濃度 0.1~10ppm となるように培養液中に添加し、インキュベータ内で 48 時間培養を行った。その後、Cell Titer-Glo®を用い細胞内在性の ATP を定量し、細胞生存率を算出した。また、微粒子 10ppm 曝露時の形態を SEM により観察した。

【結果と考察】

1) 微粒子：SEM 観察の結果、今回使用した TiO_2 、 CuO ナノ粒子の一次粒子の粒径は 100nm 以下であった。一方、 TiO_2 、 CuO マイクロ粒子の粒径は $1\mu\text{m}$ 、ITO 粒子は 20nm

であった。これはメーカーから提示されたサイズとほぼ同等の値を示した。しかし SEM 像には凝集による二次粒子の形成が観察された。そこで、DLS により溶液中での粒子サイズの測定を行った。その結果、それぞれの粒子は液中では凝集し、サブミクロンサイズの粒子として存在していた。粒子は溶液中では凝集し、一次粒子サイズよりも大きな粒子として作用することを示唆している。

2) タイムラプス法連続観察：従来、細胞形態の観察は、化学固定後行われており、粒子曝露に対する動的挙動の観察は困難であった。タイムラプス法により、微粒子に対する細胞の動的応答挙動の観察が可能になった。

TiO₂ 微粒子曝露下では、細胞は活発に動き回りながら偽足を伸展し、微粒子を捕捉、表面に捕集する様子が観察された。また、細胞分裂も粒子を付着した状態でコントロールと同様に進行した。これらの挙動に対する粒子サイズへの依存性は見られなかった。一方、CuO ナノ粒子の場合、微粒子と接触し捕捉する様子も見られたが、接触した後に形態が球状化し細胞死を起こした。CuO マイクロ粒子の場合、細胞が粒子へと接触すると活動が低下し細胞死に至った。しかし粒子と接触していない細胞は活発に動き回り、コントロールと同等の挙動を示した。ITO 粒子の場合、細かい偽足を多く出す傾向が見られ、Pt 粒子の場合には細長い仮足を出して伸展する様子が見られた。CuO 粒子に対する応答については、細胞が粒子に接触しない限りはコントロールと同等の挙動を示すが、粒子に接触すると活性が低下し細胞死を起こした。粒子サイズが低下すると、培養容器底面に均一・広範囲に分散するため、同濃度のマイクロ粒子に比べて、細胞の粒子への接触確率が増加し、その結果、細胞の活性低下や細胞死が顕著に見られたと考えられる。また、10ppm の濃度で CuO 粒子を培地に加え 48 時間経過した後、上澄み液に溶出した Cu イオン濃度は 1ppm 以下であった。そこで Cu イオンを培養液に添加して、細胞の動的挙動を観察したところ、Cu イオン 30ppm 下では、細胞はコントロールと同様に分裂増殖をしたが、細胞の表面は荒れているのが確認された。Cu イオン 50ppm 下では、細胞は曝露直後から活性が低下し、24 時間後には細胞死するものもあった。よって粒子に接触した細胞は粒子から細胞に 50ppm 以上のイオンが流れ込み急性毒性がみられたと考えられる。また、今回の実験では細胞分裂の様子がリアルタイムで観察することに成功した。細胞分裂の開始から 2 時間程で分裂が完了した（粒子、非曝露下）。細胞分裂には間期があるので、実際の 1 サイクルはそれ以上の時間がかかる。今後、周期時間を把握することにより細胞がディッシュないでコンプレントになる時間を予測することができると考えられる。

3) SEM 観察：コントロールは、紡錘状でディッシュ底面によく伸展した形態を示した。TiO₂ ではコントロールと類似した形態が観察された。CuO 曝露下では、形態の委縮・球形化が見られた。

4) 細胞毒性試験：各種粒子曝露下での細胞生存率を調べた。10ppm 曝露時、CuO ナノ粒子では、ほとんどの細胞が細胞死に至り、生存率は 1% であった。CuO マイクロ粒子での生存率は 20% であった。TiO₂ ナノ、マイクロ粒子、ITO ではコントロールに対しほとんど差はなかった。Pt での生存率は 73% と生存率低下が見られた。TiO₂、CuO については、濃度・サイズ依存性を評価した。TiO₂ では濃度・サイズに関わらず、コン

コントロールと同等の高い生存率を示した。一方、CuO の場合、生存率減少は濃度・サイズに依存せいが確認された。濃度上昇・サイズの減少に伴い、生存率の低下が見られた。細胞毒性試験の結果はタイムラプス法の結果と定性的に一致した。

【結論】

1) タイムラプス法：タイムラプス法により、通常の固定後とは全く異なるリアルタイムの形態観察（偽足伸展、微粒子捕捉、細胞分裂等の動的挙動）に成功し、生きた状態での細胞の運動様式と機能性及びそれに基づく微粒子の刺激性の評価が可能となった。

2) 粒子の物質・サイズ依存性：TiO₂ の場合、粒子サイズに関わらず細胞への影響はきわめて小さかった。一方、CuO の場合、同サイズの TiO₂ と比較して細胞への顕著な刺激性が観測された。また、サイズの減少とともにその刺激性は増加し、生存率の低下が確認された。

3) 細胞の動的挙動と細胞毒性試験：タイムラプス法観察の場合では、TiO₂ に曝露された細胞は、活発に動き、偽足の進展や細胞分裂などが見られた。一方、CuO の粒子と接触した細胞は、濃度・粒子サイズに依存した活性の低下を示し、細胞死に至った。細胞毒性試験において、TiO₂ は高濃度においてもコントロール群と同等の高い生存率を示したが、CuO の場合、低濃度においても生存率の低下が起こり、粒子サイズによる刺激性の違いも観測された。タイムラプス法により観察した細胞の動的挙動は、従来の細胞毒性試験の結果と定性的な一致が見られた。

4) 細胞機能性の観察：タイムラプス法観察を用いることにより、活動中の細胞の機能性に粒子が及ぼす影響の評価が可能となった。マイクロ・ナノ粒子では生体反応誘発性を有するため、その影響を調べる手段として本研究はきわめて有益であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝
副 査 特任教授 亘 理 文 夫
副 査 教 授 網 塚 憲 生

学位論文題名

In situ observation of dynamic response behavior of cells exposed to micro/nano particles by time lapse observation
(微粒子曝露下の細胞の動的応答挙動のその場観察と刺激性評価)

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。まず申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下の通りである。

【目的】 歯科臨床では日常的に患者や術者が歯科材料の切削・摩耗粉に曝露されている。また、薬品・化粧品の分野でもマイクロ・ナノサイズの粒子が広範囲に使用されており、それらの一部は体内へと取り込まれる可能性がある。従来、微粒子曝露時の形態観察と細胞毒性評価は細胞固定後、静的状態でなされてきた。しかし、細胞より小さいナノ粒子では細胞への相互作用を誘導するため、生きた状態での細胞挙動を観察することが必要である。本研究ではタイムラプス法を用い細胞の動的挙動の観察を行い、生きた状態でのナノ粒子に対する細胞活動と機能性を観察することを目的とした。また、従来法による細胞毒性試験も行い結果を比較した。

【材料と方法】 1) 微粒子:ナノ～マイクロサイズの TiO_2 、 CuO 、ITO (Indium-Tin Oxide) を用いた。
2) タイムラプス法連続観察: マウス骨芽細胞様細 (MC3T3-E1: 以下 E1) を培養し、定着後 PBS に分散させた微粒子を濃度 10ppm になるように培養液中に添加した。なお、添加なしをコントロールとした。37°C、5% CO_2 下で 3 分毎に 24 時間まで、タイムラプス法により撮影した (北大・ニコイメーキングセンター)。
3) 細胞毒性試験: E1 細胞を、播種・培養し、定着後分散させた微粒子を、濃度 0.1~10ppm となるように培養液中に添加し培養を行い、細胞内在性の ATP を定量し、細胞生存率を算出した。また、10ppm 曝露時の細胞の SEM 観察を行った。

【結果と考察】 従来、細胞形態の観察は、化学固定後行われており、粒子曝露に対する動的挙動の観察は困難であった。タイムラプス法により、微粒子に対する細胞の動的挙動の観察が可能になった。 TiO_2 微粒子曝露下では、細胞は活発に動き回りながら偽足を伸展し、微粒子を捕捉、表面に捕集する様子が観察された。また、細胞分裂も粒子を付着した状態でコントロールと同様に進行した。これらの挙動に対する粒子サイズへの依存性は見られなかった。一方、 CuO ナノ粒子の場合、微粒子と接触し捕捉する様子も見

られたが、接触した後に形態が球状化し細胞死を起こした。CuO マイクロ粒子の場合、細胞が粒子へと接触すると活動が低下し細胞死に至った。しかし粒子と接触していない細胞は活発に動き回り、コントロールと同等の挙動を示した。粒子サイズが低下すると、粒子が培養容器底面に均一・広範囲に分散するため、同濃度のマイクロ粒子に比べて、細胞の粒子への接触確率が増加し、その結果、細胞の活性低下や細胞死が顕著に見られたと考えられる。また、10ppm の濃度で CuO 粒子を培地に加え 48 時間経過した後、上澄み液に溶出した Cu イオン濃度は 1ppm 以下であった。そこで Cu イオンを培養液に添加して、細胞の動的挙動を観察したところ、Cu イオン 30ppm 下では、細胞はコントロールと同様に分裂増殖をしたが、細胞の表面は荒れているのが確認された。Cu イオン 50ppm 下では、細胞は曝露直後から活性が低下し、24 時間後には細胞死するものもあった。よって粒子に接触した細胞は粒子から細胞に 50ppm 以上のイオンが流れ込み急性毒性がみられたと考えられる。従来細胞毒性試験の結果とタイムラプス法により観察した細胞の動的挙動の間には、定性的な一致が見られた。しかし、タイムラプス法では従来法では得られなかった微粒子に対する細胞挙動と機能性に関するより多くの情報を得ることが可能となった。

【結論】従来、細胞形態の観察は、化学固定後行われており、粒子曝露に対する動的挙動の観察は困難であった。今回、タイムラプス法により、偽足伸展、微粒子捕捉、細胞分裂等の動的挙動の観察が可能になり、通常の固定後とは全く異なるリアルタイムの細胞の形態観察に成功し、生きた状態での細胞の運動様式と機能性およびそれに基づく微粒子の刺激性の評価が可能となった。また、タイムラプス法観察を用いることにより、活動中の細胞の機能性に粒子が及ぼす影響の評価が可能となった。マイクロ・ナノ粒子では生体反応誘発性を有するため、その影響を調べる手段として本研究はきわめて有益であると考えられる。

口頭試問では、本論分の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

1. 培養液、血清について
2. 粒子に対する細胞の応答について
 - 1) 細胞の粒子の取り込みについて
 - 2) 表面吸着について
3. 細胞の挙動・習性について
4. 毒性のメカニズムについて
5. 細胞分裂、細胞死について
6. タイムラプス法の実験方法、困難点とその克服について
7. 他の粒子、他の細胞でのタイムラプス法による観察について
8. タイムラプス法の継承、応用、発展性について
9. 今後の研究の展望について

などであった。

以上の質問に対して申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答をとおして、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展・今後の研究が期待された。

以上のことから、審査担当者全員が本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与する十分な学識・資質を有しているものと認めた。