HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Evaluation of the biocompatibility of ceramic nanoparticles with A549 lung epithelial cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	木山, 望
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12143号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61900
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Nozomu_Kiyama_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　木山　望

主査　教授　飯田順一郎
審査担当者　副査　教授　吉田　靖弘
副査　教授　鈴木　邦明
副査　准教授　吉村　善隆

学　位　論　文　題　名

Evaluation of the biocompatibility of ceramic nanoparticles with A549 lung epithelial cells

（肺上皮由来細胞 A549 に対するセラミックナノ粒子の生体適合性の評価）

審査は,審査担当者全員の出席の下,はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ,審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた．はじめに申請者から本論文の概要として以下の内容について論述された.

近年のナノテクノロジーの研究で，ナノ粒子が様々な分野で注目されている．医療の分野においてセラミックナノ粒子の様々な応用が検討されており，歯科領域においても，ナノシリカ粒子のコンポジットレジンへの配合，あるいはインプラント表面をナノアルミナ粒子でコーティングし細胞適合性を改善するなどの応用が為されている．当教室ではボンディング材に蛍光性セラミックスナノ粒子を配合し，装置撤去時に歯面に残留するボンディング材の効率的除去を図る研究を行っている．このような背景から，歯科診療の際にセラミックスナノ粒子を含む切削粉が飛散することが十分に考えられ，術者や患者に曝露される可能性があるものの，セラミックスナノ粒子の細胞適合性については十分に明らかにされていないのが現状である．そこで，本研究の目的は，ユーロピウム（Eu）含有セラミックスナノ粒子を肺上皮由来細胞（A549）および HeLa 細胞へと曝露し，細胞活性の変化，粒子の取り込みの有無の観察を行い細胞への影響を評価することとした.

方法としては，37℃，5% CO_2 環境下で，DMEM を用いて上述の細胞を培養し，Eu を添加した TiO_2, SiO_2, Y_2O_3 ナノ粒子（以下，TiO_2:Eu^{3+}，SiO_2:Eu^{3+}，Y_2O_3:Eu^{3+}とする）を曝露した．曝露濃度および曝露時間による細胞への影響を調べるため，TiO_2:Eu^{3+}，SiO_2:Eu^{3+}，Y_2O_3:Eu^{3+}ナノ粒子，および CuO ナノ粒子曝露下の細胞の形態を SEM(Hitachi S-4800)で観察した．また，様々な粒子濃度（0.1，1，10，20，30 ppm），曝露時間（24，48，72ｈ）で培養した後の細胞の活性を CellTiter-Glo assay kit(Promega, USA)を用いて測定した．さらに，粒子の細胞内

への取り込みを確認するためタイムラプス顕微鏡（Nikon A1 and Ti-E），共焦点レーザー顕微鏡（Nikon A1 and Ti-E）により観察した．

その結果，TiO_2:Eu^{3+}，SiO_2:Eu^{3+}，Y_2O_3:Eu^{3+}ナノ粒子を曝露した細胞の SEM 画像はコントロールとほぼ同様な形態であったが，CuO 粒子を曝露した A549 細胞の SEM 画像は丸く萎縮していた．また細胞活性の検討において，TiO_2:Eu^{3+}，SiO_2:Eu^{3+}，Y_2O_3:Eu^{3+}ナノ粒子を曝露した場合，両細胞とも，粒子の濃度を 0.1，1，10，20，30 ppm と上げても，細胞活性の有意な低下は見られなかった．また曝露後 24，48，72 h と曝露時間を変化させた場合にも活性の有意な低下は見られなかった．一方，CuO ナノ粒子を曝露した場合，濃度および曝露時間の増加に伴い著しい細胞の活性の低下が見られた．また，タイムラプス観察を行ったところ，セラミックナノ粒子を A549 細胞が取りこんでいる像が観察された．そこでナノ粒子曝露後の A549 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ，セラミックスナノ粒子が細胞内に取りこまれている像を確認できた．

結論として，本研究では，曝露されたセラミックスナノ粒子の細胞への取り込みが確認され，一方でナノ粒子の濃度を 30 ppm まで上昇させた場合でも細胞活性の顕著な低下は見られなかった．すなわち，これらセラミックスナノ粒子の A549 や HeLa 細胞に対する細胞毒性は低いことが示された．このことから，セラミックナノ粒子は歯科領域や医療工学分野においても安全に応用できると考えられた．

引き続き論文内容及び関連事項について,以下の項目を中心に質疑応答がなされた.

（１） ユーロピウムの性質について
（２） セラミックスナノ粒子が肺に集まる経路について
（３） TiO_2:Eu^{3+}，SiO_2:Eu^{3+}，Y_2O_3:Eu^{3+}ナノ粒子を用いた理由について
（４） CuO の毒性について
（５） 細胞の活性について
（６） 今後の研究の展開について

本研究は,歯科臨床においてコンポジットレジンの切削時などに術者・患者が体内に吸収する可能性のあるセラミックスナノ粒子の，生体に対する影響を検討した研究である．切削粉は肺に集積するとの報告から肺上皮細胞由来細胞等を用いて各種セラミックスナノ粒子の細胞への取り込み状況や細胞の活性を検討したところ，TiO_2，SiO_2，Y_2O_3 ナノ粒子においてはその安全性が確認された．本研究の成果は，今後の歯科臨床におけるセラミックスの応用に関して重要な情報を提供しており，歯科医学の発展に寄与する成果であると高く評価された.

申請者は上記の質問に対して,適切な説明によって回答し,本研究の内容を中心とした専門分野はもとより,関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された.本研究の内容は,歯科医学の発展に十分に貢献するものであり,審査担当者全員は,学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認めた.