



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Evaluation of the biocompatibility of ceramic nanoparticles with A549 lung epithelial cells<br>[an abstract of entire text]                                           |
| Author(s)           | 木山, 望                                                                                                                                                                 |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br><a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a> |
| 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/61957">https://hdl.handle.net/2115/61957</a>                                                                                     |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                       |
| File Information    | Nozomu_Kiyama_summary.pdf                                                                                                                                             |



# 学位論文内容の要約

## 学位論文題目

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)

博士の専攻分野名称      博士（歯学）      氏名   木山   望

【緒言】近年のナノテクノロジーの研究で、ナノ粒子は様々な分野で注目がされている。生体材料の分野でも、セラミックナノ粒子は様々な応用が検討されており、歯科領域においてもシリカナノ粒子がコンポジットレジンなどに配合されていたり、インプラント表面をアルミナナノ粒子でコーティングすることにより生体適合性の改善が図られている。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することにより、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。このようにセラミックナノ粒子は医療の分野でも広く研究されているが、一方でナノサイズの粒子の生体適合性については十分に明らかにされていない。歯科診療の際にもセラミックスナノ粒子を含む切削粉が飛散することがに考えられるため、術者や患者に曝露される可能性がある。セラミックナノ粒子は体内に取り込まれると肺に一時的に滞留するという報告があるため、本研究では、肺上皮由来細胞(A549)へのセラミックナノ粒子の細胞適合性について着目した。また、セラミックナノ粒子の細胞への取り込みの有無を確認するため、セラミック粒子にユウロピウム (Eu) をドーブし、セラミックナノ粒子の細胞適合性について検証を行った。Eu をドーブしたセラミックナノ粒子は赤色に蛍光するため、プラズマディスプレイなどオプトエレクトロニクス分野に応用されている。本研究ではこの発光特性を生かしてセラミックナノ粒子を曝露した細胞内での3次元的な挙動の観察も実施した。

【材料と方法】蛍光性ナノ粒子として、Eu を添加した  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$  ナノ粒子（以下、 $\text{TiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3\cdot\text{Eu}^{3+}$ とする）を作成した。粒子の形態・粒径は走査型電子顕微鏡 (SEM: S-4800, HITACHI)、粒子の結晶系についてはX線回折 (XRD: Multiflex, Rigaku)を用いて測定した。またエネルギー分散型蛍光X線分光分析 (SEM-EDS: EDAX Genesis, EDAX Japan)を用いて、粒子の化学組成と Eu のドーブを確認した。細胞実験ではまず、DMEM 培地を用いて A549 細胞を  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  環境下で培養し、得られた  $\text{TiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3\cdot\text{Eu}^{3+}$ を各々曝露した。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、 $\text{TiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3\cdot\text{Eu}^{3+}$ 、および CuO ナノ粒子曝露下の細胞の形態の SEM およびタイムラプス観察 (24h, A1 and Ti-E, Nikon)をおこなった。また、様々な粒子濃度 (0.1, 1, 10, 20, 30 ppm)、曝露時間 (24, 48, 72 h)で培養した後の細胞の活性を CellTiter-Glo assay kit (Promega) 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、共焦点レーザー顕微鏡 (A1 and Ti-E) を用いて 3D 蛍光顕微鏡観察をおこなった。

【結果】今回作成した蛍光性ナノ粒子は白色の粉末で、紫外線照射により赤色発光を示した。SEM-EDS 測定により各ナノ粒子への Eu のドーブが確認された。また SEM で観察を行ったところ、 $\text{TiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ の粒子は直径 50-80 nm の球

形であった。 $\text{Y}_2\text{O}_3\cdot\text{Eu}^{3+}$ は直径 30-70 nm,  $\text{SiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ は直径 50-100 nm,  $\text{CuO}$  は直径 30-50 nm の球形粒子であった。XRD 測定の結果からは、今回使用した  $\text{TiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$  はルチル型であることが示された。次に得られた  $\text{TiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3\cdot\text{Eu}^{3+}$  を 24 h 曝露した後の A549 細胞の SEM 観察を行った。 $\text{TiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3\cdot\text{Eu}^{3+}$  を曝露した A549 細胞の SEM 画像にはコントロール群(ナノ粒子の曝露なし)との明確な違いは認められなかったが、 $\text{CuO}$  粒子を曝露した A549 細胞の SEM 画像は萎縮し、底面から剥離しかけた様子が観察された。また細胞表面が粗ざうになるなど、コントロール群とは明らかに異なる形態を示した。次に粒子の濃度を 0.1, 1, 10, 20, 30 ppm と増加させ、細胞活性を調べたところ、濃度を 30 ppm まで上昇させてもコントロールと比較して細胞活性の低下は見られなかった。一方で  $\text{CuO}$  粒子を曝露した場合には、濃度上昇に伴い細胞活性の顕著な低下が見られた。またナノ粒子曝露時間を 24, 48, 72 h と変化させた場合にも、コントロールと比較して細胞活性の有意な低下は見られなかった。一方、 $\text{CuO}$  ナノ粒子を曝露した場合には、曝露時間の増加に伴い細胞の活性の著しい低下が見られた。タイムラプス観察により細胞とナノ粒子との相互作用についての動的な観測を行ったところ、A549 細胞がセラミックナノ粒子を捕捉しても活発に動き回り、細胞分裂も行っている様子が観察された。細胞によるナノ粒子の取り込みの有無を明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、曝露したセラミックナノ粒子の一部が細胞内に取りこまれている様子を確認できた。

【考察】セラミックナノ粒子の A549 細胞への取り込みを明らかにするため、本研究では  $\text{Eu}$  ドープナノ粒子と共焦点蛍光顕微鏡を使用した。 $\text{TiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_2\cdot\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3\cdot\text{Eu}^{3+}$  を曝露した細胞の内部には蛍光点がはっきりと観察された。また、この  $\text{Eu}$  ドープセラミックナノ粒子の濃度を 30 ppm まで上昇させて場合や曝露後の時間を 72 h まで増加させてもコントロールと比較して細胞活性の低下は見られなかった。これらの結果は、HeLa 細胞に対して行った  $\text{Eu}$  ドープセラミックナノ粒子の細胞適合性試験の結果とよく一致している。このことからナノ粒子の細胞内への取り込みが認められるものの、今回検討したセラミックナノ粒子は肺上皮細胞に対する細胞適合性が示された。これらの結果から、口腔内での歯科治療作業により生じたセラミックナノ粒子が、誤嚥や作業環境雰囲気への飛散による患者や術者へと暴露された場合に、これらナノ粒子の到達・滞留が懸念される肺上皮への生体適合性が示唆された。

【結論】本研究では、曝露されたセラミックナノ粒子が細胞内部で観察され、ナノ粒子の細胞への取り込みが確認された。一方、ナノ粒子の濃度を 30 ppm まで上昇させた場合でも活性の顕著な低下は見られず、これらの粒子の A549 細胞に対する細胞適合性が高いことが示された。これらの結果から、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安全に応用できると考えられる。