## ナノ粒子曝露が真皮中の線維芽細胞に与える影響の 定量的リアルタイム解析

物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点

柴 弘太

Recently, the effect of nanoparticles on living things has attracted much attention because of the increasing opportunities to use the nanoparticles in such areas as environmental purification, biology, medicine, cosmetology, and so on. As nanotechnology advances, the nanoparticles with desired properties have become available. On the other hand, nanoparticle-induced toxicity has been reported. Therefore, it is important to quantitatively understand risks of the nanoparticles before using them, though the effect of the nanoparticles, especially in the case of an uptake through skins, is still not yet unclear. In this study, we synthesize monodispersed titania-based nanoparticles with controlled size (70-500 nm) as a model material to investigate the nanoparticle effect. In addition, a characterization system for such effect is developed using a membrane-type surface stress sensor (MSS), which can detect surface stress applying on its surface with high sensitivity and in real-time. Taking advantage of the photoactivatable cell-culturing substrate reported before (J. Nakanish *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 6694-6695 (2007).), we demonstrate that cell-culturing only on top of the MSS is possible.

### 1. 緒 言

近年、トイレタリー・化粧品分野において、例えば「白金ナノコロイド」などの名称で、ナノ粒子の利用が一般に認知される機会が増加している。PM2.5問題の深刻化を一つのきっかけに、ナノ粒子が生体に及ぼす影響にも関心が集まりつつあることからも、ナノ粒子が引き起こす効果の定量的な評価と、摂取可能量に関する指標確立は喫緊の課題と言える。現在のところ、経口や経鼻によるナノ粒子 摂取に関する研究が着実な進展を見せる一方、経皮に着目した研究は少ないのが現状である<sup>1-3)</sup>。

そこで本研究では、経皮によるナノ粒子曝露の影響を定 量評価するための第一歩として、モデル粒子の合成に加え、 これら粒子が真皮中の線維芽細胞に与える影響を調べるた めの測定系を構築した。検出部として、表面に生じる応力 をリアルタイムに精密測定可能な、膜型表面応力センサー (MSS)を用い<sup>4)</sup>、この表面上での細胞培養を試みた。 MSSの検出限界はおよそ0.2mN/mであり、細胞が膜表面 で集合的に振動した場合に生じる応力がおよそ2mN/m であることから<sup>5)</sup>、検出は原理的に可能であると考える。 細胞の挙動をMSSにより確実に検出するため、膜表面に 位置選択的に細胞を培養するための条件も検討した。

Real-time and quantitative analysis of the effect of nanoparticles on fibroblasts in the dermis

#### Kota Shiba

WPI Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science (NIMS)

#### 2. 実 験

#### 2.1 試薬

モデル粒子として、チタニアをベースとしたハイブリッ ド粒子を合成するため、チタニウムテトライソプロポキシ ド (TTIP)、イソプロピルアルコール (IPA)、オクタデシ ルアミン (ODA)を用いた。

#### 2.2 モデル粒子の合成

サイズの揃ったチタニア – ODA ハイブリッド粒子の作 製には、マイクロリアクタを組み込んだフロー式の合成系 を利用した (図1)<sup>6-8)</sup>。

粒子合成手順の一例を以下に示す。TTIP(0.595 mL) のIPA(12.26g)溶液(溶液A)と、IPA(12.65g)水(0.100 mL)



図1 マイクロリアクタを利用した核形成・粒子成長分離型合成 システムの概要。マイクロリアクタチップ内で核形成が起こり、 形成した核が別の原料溶液中へ吐出され、そこで粒子成長が起 こる。動的光散乱測定の結果、マイクロリアクタ内での核形成 が示唆された

溶液(溶液B)を、シリンジポンプを用いて流速20mL・ min<sup>-1</sup>で送液し、Y字型の混合部を有するPTFE製マイク ロリアクタ内で混合した。混合液を別途調製しておいた ODA (0.0684g)を含むIPA (49.32g)水(0.300 mL)溶 液(溶液C)へ吐出し、溶液AおよびBの全量を吐出する までの約40秒間、撹拌を続けた。室温で24時間静置した 後、吸引濾過あるいは遠心分離による固液分離、IPAによ る洗浄、60℃で一晩の乾燥過程を経て、試料粉末を得た。

#### 2.3 MSSチップの作製

MSSチップは、既報にしたがい、SOI基板を利用して一 般的な半導体プロセスにより作製されたものを用いた<sup>4)</sup>。

#### 2.4 MSSチップ上への光応答表面の作製

MSSチップ上への位置選択的な細胞培養は、図2に示 すような光応答表面を利用した方法により行った<sup>9</sup>。光照 射によって脱離する官能基を備えたシランカップリング剤 によって、シリコン製のMSSの表面を被覆し、蛍光顕微 鏡を用いて局所的にUV光を照射する。その後、細胞吸着 剤を適用することで、任意の位置に細胞を配置することが 可能になる。

#### 2.5 細胞培養

MSS表面への培養可能性を探る予備的な検討を行う目 的で、まずは一般に広く使用されているHeLa細胞を用い た。培地はRPMI-1640を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養し た。

#### 結果および考察

#### 3.1 単分散チタニア - ODA ハイブリッド粒子の合成

ナノ粒子曝露が細胞に与える影響を定量的に調べるため の前提条件として、

- ・ナノ粒子のサイズが揃っている
- ・ナノ粒子の形状が揃っている
- ・ナノ粒子のサイズを制御できる

以上が求められる。筆者はこれまで、チタニア、シリカを はじめとする種々の酸化物系ハイブリッドナノ粒子の合成 に従事し、単分散粒子合成についてのノウハウを確立して きた。その概要を図1に示す。本手法は、マイクロメート ルサイズの微小な空間を化学反応に利用可能な、いわゆる 「マイクロリアクタ」を組み込んだフロー式の合成法であ り、大きく2つの段階から構成される。それは、マイクロ リアクタ内での原料の1次混合と、1次混合後の反応液を さらに別の原料と混合することによる2次混合である。チ タニア系粒子の合成には、原料としてTTIPを用いること が多く、この加水分解・縮重合反応により、粒子の形成・ 成長を誘起する。しかし、TTIPの加水分解はきわめて短 時間に進行することが知られており、一つの容器に順次原 料を加えて、閉鎖系で反応させるようなバッチ合成では、 局所的に反応が進行してしまい、結果として多分散粒子が 形成するという問題が生じやすい。これを回避するための 方法として、加水分解に必要な水をごく少量ずつ加えるこ とにより(多くの場合、TTIP:水のモル比が1:3程度)、 反応をゆっくり進行させることが有効とされてきたが、こ の場合は未反応の原料が残存しやすく、収率の低下が問題 となる。そこで本手法においては、1次混合時のTTIP: 水のモル比を1:3程度とし、ここで粒子の「核」のみを 形成させることを試みた。動的光散乱測定により、1次混 合直後の反応液中にはおよそ2~3nm 程度の微細な粒子 が存在しており、核の形成に成功したことが示唆された。 次いで、この核を含む反応液を、ODA および1次混合時 と比較して多量の水を含む原料液と2次混合することで、 粒子の成長を期待した。その結果、図1右下のSEMに示



図2 光応答表面を利用した細胞配置・操作技術の模式図。光照射によって脱離するニトロベンジル基を備えた NPE-TCSP などの シランカップリング剤によって、表面応力センサーのシリコン表面を被覆する。これを BSA などで被覆し、細胞の吸着を阻害す る表面を作製する (a)。蛍光顕微鏡を用いて、局所的に紫外光を照射することで、ニトロベンジル基を脱離させた後 (b)、細胞吸着 剤である Fibronectin などを被覆することで、任意の位置に細胞を配置し、さらにその成長を誘導することが可能になる (c)。(d) 生きた細胞の配置・誘導の例

すようなサイズの揃った粒子を得ることができた。核形成 と粒子成長の過程を分離することが、単分散粒子を得る上 できわめて重要であることは古くから指摘されているが<sup>10</sup>、 合成条件をランダムに振るなどして最適条件を探していく 以外、具体的な指針は得られていなかった。本手法を用い ることで、1次混合で核を作りさえすれば、2次混合以降 の反応環境を工夫することにより、最終生成物のサイズを 調整できる可能性が示された。

次に、サイズ制御の可能性を明らかにするため、2次混 合時の条件を検討した。2次混合前の段階では、未反応の TTIPが存在していると考えられるため、まずは原料を完 全に消費することに焦点を絞り、2次混合時の水/IPAモ ル比の影響を検討した。その結果、水/IPAモル比を大き くしていくことにより、段階的にサイズの小さな粒子が生 成することが分かった(図3)。Tiベースの収率は、いず れの場合も90%以上であった。ODAを添加せずに合成し た場合、不定形の凝集粒子が得られたこと、Tiベースで 計算した収率が約50%程度であったことも考慮すると、 粒子の成長機構には疎水性相互作用が関係していると考え られる。つまり、ODAはアルキル鎖を外側に向けてチタ ニア粒子と相互作用しており、反応系に存在する水の量が 増えるほど、最表面が疎水的なチタニア – ODAは、表面 エネルギーを小さくするために周囲のチタニア – ODAと 相互作用(凝集)して、球状粒子を形成している可能性が ある。水の量が少なければ、個々の粒子は大きく成長でき るはずであり、これらのことは実験結果と一致している。 アルキルアミンを用いたチタニア-アルキルアミン複合体 形成に関する以前の報告において、アルキルアミン中のア ミノ基と、チタニア表面の水酸基が水素結合により相互作 用することが指摘されており<sup>11)</sup>、本系においても、同様の 現象が起こっているものとみられる。水/IPAモル比を調 節することにより、チタニア-ODA粒子のサイズは70nm ~ 500nm程度の範囲で制御可能であることが分かった。 他の実験パラメータに関しても検討を進めており、予備実 験の結果、既に10nm程度から1200nm程度までの広い範 囲でサイズ制御できること見出している。今後、結果をま とめて報告する予定である。

#### 3.2 MSSの構造と基本性能

MSSは、「ナノメカニカルセンサー」<sup>4.12,13)</sup>と呼ばれる タイプのセンサーの一種であり、代表的なカンチレバー型 のセンサーを構造最適化することで、性能の飛躍的向上に 成功したものである<sup>4)</sup>。これは、センサーチップに埋め込 まれているピエゾ抵抗を用いた読み取り方法に基づくセン サーであり、図4にその基本的構造を図示した。MSSは「カ ンチレバー」構造と異なり、4つのピエゾ抵抗「検出ビー



図3 溶液 C 中の水 /IPA モル比を変えて合成したチタニア - ODA 粒子の SEM 像とサイズ分布

ム」によって支持された「吸着メンブレン」から成り、そ れら4つのピエゾ抵抗が完全ホイートストンブリッジを構 成する。吸着メンブレン上に表面応力が印加されることに よって生じるメンブレンの変形が、増幅された一軸性の応 力としてピエゾ抵抗ビームに効率的に変換される。プロト タイプMSSの評価実験によって、標準のピエゾ抵抗カン チレバーの20倍以上の感度が得られることが明らかにな り、光学的読み出しカンチレバーセンサーと同等の感度が 実証された。このセンサーは、本研究を遂行するにあたっ て、以下のような様々な長所を有する。

- ・超高感度(吸着メンブレン上のサブナノメートルの変 形も検出可能)
- ・光学系が不要(細胞による屈折率変化の影響が無い)
- ・高濃度・不透明溶媒(細胞培養環境)中で測定可能
- ・静的な測定のため、液体によるダンピングの問題が無い



図4 MSS の構造と電気配線の模式図



- ・導電性液体中でも安定な動作が可能(1ヶ月以上の安 定な測定を確認済み)
- ・センサー内の完全ホイートストンブリッジ構成により 熱ドリフトが少ない

MSSのプロトタイプ (1G-MSS) は、 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ のシリ コンチップ上に8つのメンブレンが一次元に配列した構造 を有する。1G-MSSの最小検出可能表面応力は0.2~ 0.3 mN/mであり、これまでに報告された細胞牽引力が2 mN/m程度であることから5)、さらなる感度の向上が必要 であった。そのため、シリコンの特性や微細加工技術を踏 まえた最適化を各構成要素に適用することで、感度向上を 試みた。構造最適化を行う上で、チップサイズが大きくな ると、測定チャンバーも大きくする必要があり、より多く の試料が必要になるだけでなく、チップ上の各メンブレン において、試料や培養条件の不均一化が懸念される。その ため、チップサイズを小さく保つために、3×3の合計 9チャンネルの二次元配列 MSS (2G-MSS) チップを作製 した (図5(a))。さらに、各MSSチャンネルの感度を向上 させるために、以下の通り、各構成要素の最適化を行った 14) o

- (3.2µm → 2.5µm)
- ピエゾ抵抗部分の保護膜を薄く (CVD SiO<sub>2</sub> 650 nm + LPCVD Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 100 nm → 熱酸化SiO<sub>2</sub> 80 nm + LPCVD 80 nm)
- 3) ピエゾ抵抗部のホウ素ドープを浅く(~500nm→~ 300nm)
- 4) ピエゾ抵抗部の負の領域を排除(電流と応力の方向を



図5 (a) 2G-MSS チップの写真。MSS センサー素子が 3×3 の合計 9 個、二次元配列されている。下部は 0.5 mm ピッチの電極であり、これを標準の 0.5 mm ピッチコネクタに差し込むことで、ワイヤーボンディングな どをすることなく、すぐに測定が開始できる。(b) 2G-MSS、1G-MSS、およびピエゾ抵抗カンチレバーから のシグナル。2G-MSS は、1G-MSS、ピエゾ抵抗カンチレバーと比べて大幅に感度が向上していることが確認 できる。poly (sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) をインクジェットにより 1µm 被覆し、100 mL/min で水蒸気 を含む窒素ガスと純窒素ガスを 3 分間ずつ曝露

考慮して最適化)

これらの構造最適化の効果を、有限要素解析によって確認したところ、1G-MSSチップと比較して、約2.8倍の感度向上が見込めることが明らかになった。これらの最適化を行った2G-MSSチップの感度を実験的に検証してみたところ、1G-MSSの約4倍のシグナルを示した(図5(b))。これはピエゾ抵抗「カンチレバー」センサーと比較して、約100倍の感度であり、一般的に使用されている光(レーザー)読み取り型のカンチレバーセンサーと比較しても、数倍高い感度を有していることが確認された<sup>14)</sup>。

# 3.3 光応答表面作製技術を利用したMSSチップ上へのHeLa細胞の位置選択的培養

光応答表面修飾 MSS チップは、以下の手順で作製した。 まず、MSS チップ上の9つのメンブレンの表面を、末端 に活性エステルを有する光分解性シランカップリング剤 (TMS-2NP-NHS)によって修飾し、アミノポリエチレン グリコール (PEG、分子量12,000)と反応させた。その後、 いくつかのメンブレンにのみ蛍光顕微鏡を用いて紫外光を 照射し、シランカップリング剤の分解に伴ってPEGを除 去することにより、細胞吸着メンブレンを作製した。他の メンブレンはPEGで被覆されているため、細胞の吸着が 抑制される。ここにHeLa細胞を播種し、24時間培養した 後、正立顕微鏡を用いて観察した結果を図6に示す。特定 のメンブレンにのみ細胞が培養されている様子が確認でき る。これにより、MSSチップに光応答表面を適用するこ とによって、任意のメンブレン上にのみ細胞を配置するこ とが可能であることが実証された。

#### 4. 総 括

マイクロリアクタを組み込んだフロー式の合成装置を用 いて、オクタデシルアミン存在下、チタニウムテトライソ プロポキシドの加水分解・縮重合反応を行うことにより、 サイズの揃った真球状のチタニア-オクタデシルアミンハ イブリッド粒子を得た。粒子形成反応の開始に必要な水に 着目し、合成時の水/イソプロピルアルコールのモル比を 変えることにより、70nmから500nmの範囲でサイズの揃 った粒子を得られることが分かった。また、表面に生じる 応力変化を高感度かつリアルタイムに測定可能な膜型表面 応力センサー上に、HeLa細胞を培養する条件を検討した。 紫外光照射により分解するシランカップリング剤を用いて 表面修飾し、その上に細胞の吸着を抑制するアミノポリエ チレングリコールを反応させた後、センサー表面にのみ紫 外光照射することでポリエチレングリコールを除去した。 これにより、位置選択的な細胞培養が可能であることを実 証した。今後はセンサーによる測定と、顕微鏡による直接 観察が可能な測定システムを構築することにより、ナノ粒 子が細胞に与える影響に関して、詳細な検討を進めていく 予定である。



図 6 光応答表面修飾 2G-MSS チップ上に成長した細胞の顕微鏡写真。(b)(d)(e)(f) は紫外光を照射し、 PEG を除去した細胞吸着メンブレンであり、(a)と(c)は、PEG 被覆されているメンブレンである。細胞吸 着メンブレンにのみ細胞が吸着していることが確認できる

#### 謝 辞

MSSチップを用いた実験全般は、物質・材料研究機構 の吉川元起博士の協力を得て行いました。また、光応答表 面を利用した位置選択的な細胞培養は、物質・材料研究機 構の中西淳博士の協力を得て行いました。ご多忙中にもか かわらず、快くお力添え下さったお二方に、心より感謝申 し上げます。

#### (参考文献)

- Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW, : Nanoparticles: harmacological and toxicological significance, Br. J. Pharmacol., 150, 552-558, 2009.
- 2) Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Laird Forrest M, Stroeve P, Mahmoudi M, : Toxicity of nanomaterials, Chem. Soc. Rev., 41, 2323-2343, 2012.
- Hoet PHM, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV, : Nanoparticles – Known and unknown health risks, J. Nanobiotechnol., 2, 2-12, 2004.
- 4) Yoshikawa G, Akiyama T, Gautsch S, Vettiger P, Rohrer H, : Nanomechanical membrane-type surface stress sensor, Nano Lett., 11, 1044-1048, 2011.
- 5) Bischofs IB, Schmidt SS, Schwarz US, : Effect of Adhesion Geometry and Rigidity on Cellular Force Distributions, Phys. Rev. Lett., 103, 048101-1-048101-4, 2009.
- 6) Shiba K, Ogawa M, : Microfluidic syntheses of welldefined sub-micron nanoporous titania spherical particles, Chem. Commun., 6851-6853, 2009.
- 7) Shiba K, Kambara K, Ogawa M, : Size Controlled Syntheses of Nanoporous Silica Spherical Particles

through Microfluidic Approach, Ind. Eng. Chem. Res., 49, 8180-8183, 2010.

- 8) Shiba K, Onaka K, Ogawa M, : Preparation of monodispersed titanium dioxide-octadecylamine hybrid spherical particles in the submicron size range, RSC Adv., 2, 1343-1349, 2012.
- 9) Nakanishi J, Kikuchi Y, Inoue S, Yamaguchi K, Takarada T, Maeda M, : Spatiotemporal control of migration of single cells on a photoactivatable cell microarray, J. Am. Chem. Soc., 129, 6694-6695, 2007.
- LaMer VK, Dinegar RH, : Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols, J. Am. Chem. Soc., 72, 4847-4854, 1950
- Wang YD, Ma CL, Sun XD, Li HD, : Synthesis and characterization of mesoporous TiO2 with wormholelike framework structure, Appl. Catal. A: Gen., 246, 161-170, 2003.
- 12) Gimzewski JK, Gerber C, Meyer E, Schlittler RR, : Observation of a chemical-reaction using a micromechanical sensor, Chem. Phys. Lett., 217, 589-594, 1994.
- Thundat T, Warmack RJ, Chen GY, Allison DP, : Thermal and ambient-induced deflections of scanning force microscope cantilevers, Appl. Phys. Lett., 64, 2894-2896, 1994.
- 14) Yoshikawa G, Akiyama T, Loizeau F, Shiba K, Gautsch S, Nakayama T, Vettiger P, de Rooij NF, Aono M, : Two Dimensional Array of Piezoresistive Nanomechanical Membrane-Type Surface Stress Sensor(MSS) with Improved Sensitivity, Sensors, 12, 15873-15887, 2012.