

(様式第5号)

XAFS を用いた大気中 Fe 含有ナノ粒子の細胞内存在状態解析 XAFS measurement of Fe speciation in cultured cells exposed to atmospheric Fe nanoparticles

宇都宮 聡
Satoshi Utsunomiya

九州大学大学院理学研究院化学部門
Department of Chemistry, Kyushu University

- ※1 先端創生利用(長期タイプ、長期トライアルユース)課題は、実施課題名の末尾に期を表す(I)、(II)、(III)を追記して下さい。
- ※2 利用情報の開示が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後二年以内に研究成果公開(論文(査読付)の発表又は研究センターの研究成果公報で公表)が必要です。(トライアルユースを除く)

1. 概要 (注：結論を含めて下さい)

現在問題となっているPM2.5は、2.5ミクロンよりも小さい大気微粒子であるが、これら微粒子の存在状態、生体細胞との相互作用による変化は、具体的な知見が不足している。本課題では、負の健康影響を引き起こす原因となる大気微粒子、遷移金属溶存種とその酸化物ナノ粒子の生体細胞毒性を評価することに加えて、それらの培地中でのFe、Mn、NiのXAFS測定を行うことで、細胞内での重元素の主要化学種を特定し、生体中におけるナノ粒子中重金属元素の化学状態変化を明らかにすることを目的とした。溶存Feは培地中で一部水酸化鉄として沈殿し、1日後には別の化学種へ変化していることが分かった。磁鉄鉱ナノ粒子の投与では22日後まで変化は見られず、細胞環境において安定して存在することが示唆されたが、NIST1649a中のFe化学種に変化が見られ、ferrihydrite様物質になっている可能性がある。Mn-ferriteも同様に安定して存在すること、溶存したMnはDMEM培地中で二価が三価へと酸化することが分かり、細胞内環境において酸化還元反応に寄与する可能性がある。また、Niは溶存種が存在する場合、水酸化物への相変化が起こる可能性が示唆され、その有害性増加に繋がると考えられる。

Adverse health effects of atmospheric fine particles have attracted an increasing attention owing to the recent concern on PM2.5 transported from the Chinese continent; however, little is known about the nature and interaction of those fine particles with biological system. In the present study, we have investigated the chemical state of three transition metals (Fe, Mn, and Ni) in the environment exposed to the living cells by measuring XAFS, in order to understand the transformation of the chemical state of these transition metals. In the case using soluble Fe, Fe hydroxide appears to precipitate both in DMEM and EMEM, then the speciation changes after one day. In the case that magnetite and Mn-ferrite nanoparticles are introduced, no significant changes are seen even after 22 days, indicating the use of those nanoparticles in the cancer therapy does not cause any health concern. On the other hand, the Fe speciation in NIST1649a has changed after 22 days of exposure.

Soluble Mn in DMEM appears to change its oxidation state from divalent to trivalent, implying the possibility to participate the redox reaction in the interaction with the living cells. In addition, the speciation of soluble Ni in both DMEM and EMEM changes to the form of hydroxide, which may lead to the increase in the toxicity.

2. 背景と目的

現在日本各地で観測されて注目されている PM2.5 問題は、2.5 ミクロンよりも小さい大気微粒子が引き起こす健康被害に対する懸念に基づいている。しかしながら PM2.5 がどのような粒子で構成され、どのように細胞で変化するか具体的な知見が不足している。特にサブミクロンサイズの粒子は非常に大きい比表面積、拡散、生体への影響、熱的安定性の変化のため、その化学的、物理的、生化学的挙動を把握する必要がある。これまで先行研究によって、日常的に生体が暴露している様々な大気粒子、標準物質に関しては、疫学的研究に基づいて肺がんのリスク上昇を引き起こすなど、負の健康影響が報告されてきた。一方で大気粒子の状態解析や、生体との相互作用による PM の状態変化を解明する研究は限られてきた。我々はこれまでに大気中微粒子を対象として XAFS 分析を行い、大気微粒子中に存在する重金属の化学種

を明らかにするとともに、透過型電子顕微鏡法による直接分析と組み合わせたバルクレベルの平均からナノレベルの個別粒子までマルチスケールでの解析手法を構築してきた。本課題では、負の健康影響を引き起こす原因となる大気微粒子、遷移金属溶存種とその酸化物ナノ粒子の生体細胞毒性を評価することに加えて、それらの培地中での Fe、Mn、Ni の XAFS 測定を行うことで、細胞内での重金属の主要化学種を特定し、生体中におけるナノ粒子中重金属元素の化学状態変化を明らかにすることを目的とした。

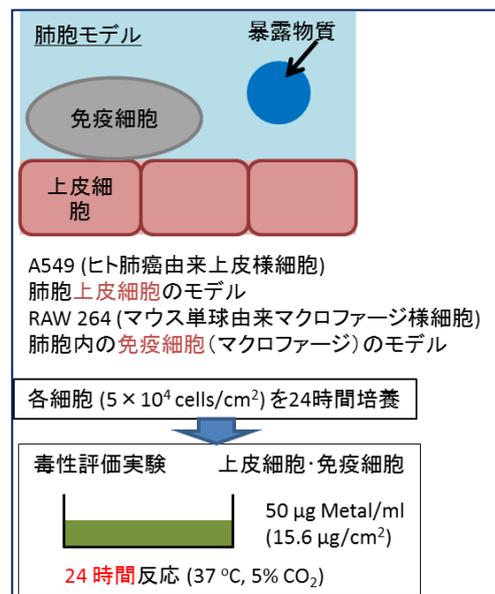
3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

暴露物質は、標準大気試料（NIST1649a）と都市大気中に普遍的に見られるフェライト粒子、またそれらに含まれる Fe³⁺（FeCl₃）、Mn、Ni などの溶存化学種とした。これらの重金属元素を含むフェライトは、これまでの大気微粒子の状態解析で明らかとなった Fe 含有粒子の主要な結晶構造である。測定試料は、肺胞を構成している上皮細胞、免疫細胞の2種類の細胞に暴露物質を投与し、人体への大気微粒子の吸引暴露を模擬した細胞試料とする。使用する細胞は A549（ヒト肺癌由来上皮様細胞株）、RAW264（マウス単球由来マクロファージ様細胞株）であり、理化学研究所・バイオリソースセンターから購入した。系の説明、実験の簡単な流れを右図に示した。

標準大気試料、フェライト粒子と FeCl₃ を暴露させた細胞試料を対象とし、細胞中に含まれる微量元素 Fe、Mn、Ni、Cr の化学状態（酸化数、主要化学種）を XANES スペクトルから調べ、細胞内 Fe の化学種・相同定を行い暴露濃度、時間の違いによる変化の有無を調査する。測定は、最初に各対象元素の異なる化学状態（酸化・結合状態）の純物質試薬を用いてそれぞれの K 吸収端を透過法で測定し、標準物質のスペクトルとする。本実験で対象とする遷移金属元素の K 吸収端のエネルギー値はそれぞれ Fe K-edge (7112 eV)、Mn K-edge (6539 eV)、Ni K-edge (8333 eV)、Cr K-edge (5989 eV) であり、測定範囲は 1 keV とした。

細胞試料は石英プレート、polycarbonate メンブレンフィルター等の基盤上に固定し、小ビニールサンプル袋に入れて密封した状態で測定した。基盤への細胞固定は、基盤を予め細胞培養の際に加えておく方法と、粒子暴露後に培養容器からはがし、細胞懸濁液を基盤上で乾燥させる方法を用いる。

試料はスライド枠状の標準的な試料ホルダーにそのまま設置する。測定はシリコンドリフト検出器（SDD）を用いて蛍光法で行った。測定はすべて常温、大気下で行った。



4. 実験結果と考察

XANES スペクトルの結果を次ページ Fig. 1~6 に示した。Fig. 1(a)には様々な酸化数を持つ多様な Fe 化合物と NIST 標準物質の Fe K 吸収端をまとめた。以前に取得したスペクトルに新規の物質を追加したものであるため化学シフト等の詳細は割愛するが、追加した transferrin、ferritin は比較的ブロードな特徴を呈する一方、Mn, Ni-ferrite は類似した複数の吸収端極大ピークを示し、Fe 原子の結合状態、対称性、電子軌道構造が類似していることが分かる。Fig. 1(b)は Fe³⁺塩化物水溶液、それを DMEM, EMEM に添加した試料、また二種類の細胞に投与して 1 日後の Fe K 吸収端の測定値を示している。Upper と lower は上澄みと懸濁沈殿物のスペクトルを示しており、沈殿物は ferrihydrite に近い化学状態となっていることが示唆された。一方で、培養液、細胞投与後の Fe 化学種は、投与前の FeCl₃とは異なることが分かり、投与後に Fe 化学種の変化があったことが分かる。Fig.2 には magnetite 微粒子の A549 に対する長期暴露実験後の Fe の K edge スペクトルを示している。Mgt+と Mgt-は magnetite に血清を添加か非添加かの違いを表しているが、どちらの実験系においても顕著な変化は見られなかった。NIST 都市大気標準 A549 ではピーク形状に若干の変化が見られ、ferrihydrite 様の状態へ変化していることが推測される。

Fig.3 には同様の実験を RAW264 に対して行った結果を示しており、A549 の場合と同じく magnetite の状態に変化が見られなかったが、NIST1649a には 13 日後に顕著な XANES の変化が見られた。また、同様の実験を Mn-ferrite を用いて RAW264 に対して投与したところ、投与前の吸収端近傍構造と比較して、いくらか吸収の効果があったためか、実サンプルの方がピークの圧縮があるように見えた。Fig. 5 に Mn の XANES K 吸収端の測定結果を載せた。Fig.5 左図は標準物質、培地中に MnCl₂を添加した試料についての結果をまとめており、DMEM に添加した MnCl₂は上澄みと底部でほぼ一致したスペクトル形状をとり沈殿等は生じていなかったが、添加前の MnCl₂のスペクトル形状とは異なることから、添加した段階で Mn が培地成分と結合して変化を起こしたと考えられる。形状としては 6550 eV 付近のみが強調される硫酸塩に結合状態に近いものと推測される。EMEM へ添加した Mn は一日後も A549 投与後も変化が見られなかったが、DMEM の場合はスペクトル形状の変化と高エネルギー側へのシフトが顕著であった。シフト後の極大値のエネルギーは Mn³⁺のものと一致し、DMEM を用いた添加の際には短時間における Mn の 2 価から 3 価への変化を考慮に入れる必要がある。また、Mn-ferrite 投与の実験結果 (Fig. 5 右図) からは、Mn ferrite 中の Mn の化学状態に顕著な変化が見られず、バルク平均的には 7 日間で Mn ferrite の相変化は起きていないことが分かった。

Ni の K 吸収端スペクトルの測定結果を Fig. 6 にまとめた。~8345 eV 付近の極大ピーク以外にも 8360 eV の特徴的な極大は Ni(OH)₂、NiO、NiFe₂O₄に見られる。大気サンプルにもこの 8360 eV 付近のピークがあることから、これら三相が存在している可能性がある。また、NiCl₂を添加した培地では上部、下部で相違はなく、懸濁物の生成はないことが分かる。添加した後に乾燥した試料のスペクトルは最大極大ピークの半値幅が広がっていることが分かり、水酸化物の生成が示唆された。

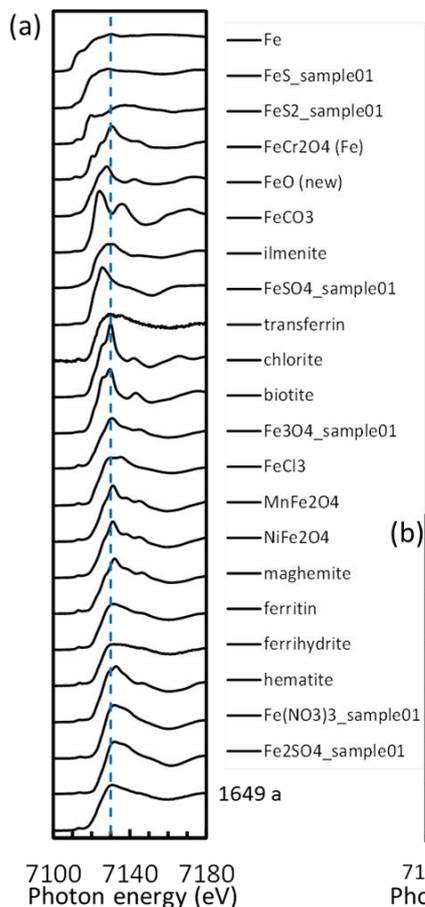
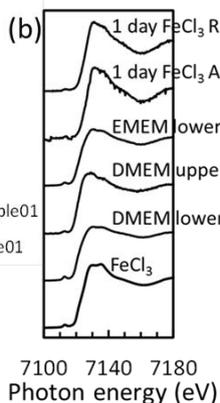


Fig. 1. (a) Fe K edge of the pure chemical reagents and PM.



(b) Fe K edge of FeCl₃ in media.

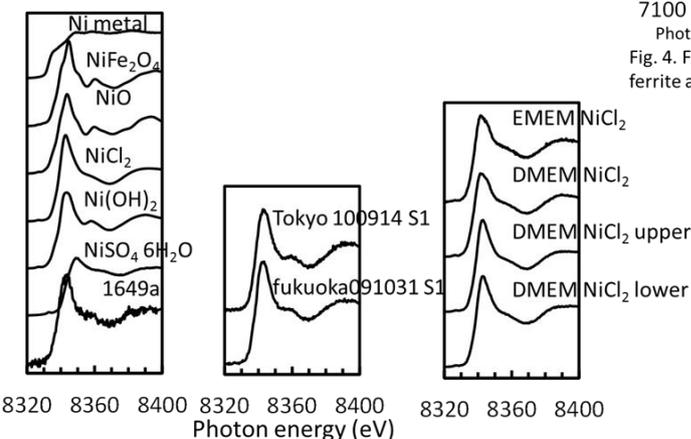


Fig. 6. Ni K edge of Ni reagents, PM and the culture media

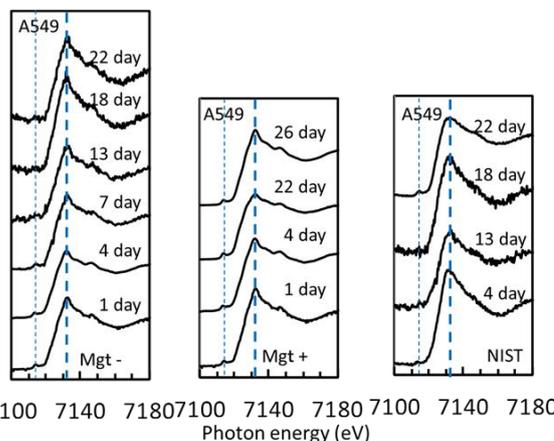


Fig. 2. Fe K edge of A549 after the long-term exposure

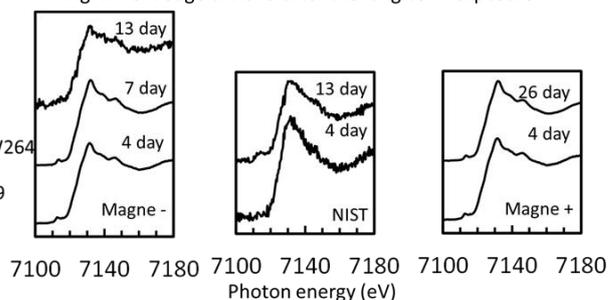


Fig. 3. Fe K edge of RAW264 after the long-term exposure

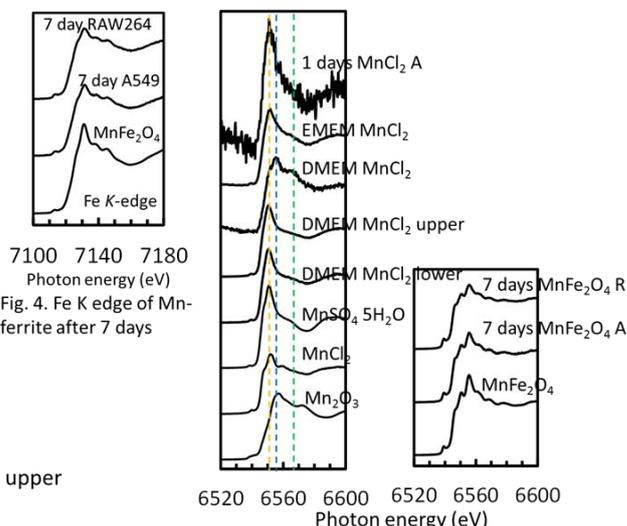


Fig. 4. Fe K edge of Mn-ferrite after 7 days

Fig. 5. Mn K edge of the chemical reagents, the culture media and the cells

以上の一連の結果から、遷移金属の化学種は、溶存種の場合培地添加時での変化、さらに投与後の変化が起きることが示唆されたが、ナノ粒子暴露時の変化はほとんど見られない。今後局所的な TEM 観察、免疫学的な実験結果との融合を行い、総合的な毒性評価へと展開する。

5. 今後の課題

本研究では XANES で化学種の変化をみる事ができたが、複数種含まれる化学種を定量的に評価することは困難であった。今後は試料を絞って EXAFS 領域まで測定し、より定量的に評価する必要がある。また、TEM (透過型電子顕微鏡) を用いた個別細胞分析も同サンプルに対して行い、XAFS 解析結果

と組み合わせ高精度の化学種・存在状態同定を行い、細胞内におけるナノ粒子の化学的挙動を理解する必要がある。

6. 参考文献

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

1. M. Roursgaard, S.S. Poulsen, L.K. Poulsen, M. Hammer, K.A. Jensen, S. Utsunomiya, R.C. Ewing, T. Balic-Zunic, G.D. Nielsen and S.T. Larsen. Time-response relationship of nano and micro particle induced lung inflammation. Quartz as reference compound. *Human Exp. Toxicol.*, 29 (2010) 915-933.
2. M. Morishita, G. J. Keeler, J. D. McDonald, J. G. Wagner, L. H. Young, S. Utsunomiya, R. C. Ewing, J. R. Harkema. Source-to-receptor pathways of anthropogenic PM2.5 in Detroit, Michigan: Comparison of two inhalation exposure studies. *Atmospheric Environment*, 43 (2009) 1805-1813.

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3)

大気微粒子、細胞毒性、XANES

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消して下さい。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入して下さい(2012年度実施課題は2014年度末が期限となります。))

- | | | | |
|----------------|--------|-------|-----|
| ① 論文(査読付)発表の報告 | (報告時期： | 2015年 | 3月) |
| ② 研究成果公報の原稿提出 | (提出時期： | 2015年 | 3月) |