

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進事業

ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の
組織反応性とバイオ応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成17(2005)年3月

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進事業

ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の
組織反応性とバイオ応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用…… 1
亙理 文夫

(研究協力者報告)

- a. カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用……30
赤坂 司
- b. カーボンナノチューブならびにカーボンナノロッドによる……49
マクロファージならびにマウス脾臓細胞の活性化
柴田 健一郎
- c. カーボンナノチューブによる細菌の吸着……56
柴田 健一郎
- d. カーボンナノチューブ・ファイバーの歯根膜由来細胞株培養系における……59
細胞増殖活性ならびアルカリフォスファターゼに及ぼす影響
田村 正人
- e. リポソームのカーボンナノチューブ組み込みに関する基礎的研究……68
鈴木 邦明
- f. カーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウムコンポジットコロイド:……73
特性および生体適合性の研究とバイオテクノロジー応用
古月 文志
- g. X-線を用いたナノクラスターキャラクタリゼーション手法の開発研究……77
朝倉 清高
- h. カーボンナノチューブの細胞に対する影響……84
—アルギン酸ビーズに内包されたカーボンナノチューブによる細胞増殖
及び芳香族化合物の吸着に関して—
柴 肇一
- i. カーボンナノカプセルの加熱時安定性評価及び生体内ナノ微粒子の……90
状態分析に関する研究
宇尾 基弘

II. 分担研究報告

1. ハイパーサーミア（温熱療法）への応用を目指した磁性ナノ粒子の……94
合成とサイズ分級
田路 和幸

2. ナノ微粒子の生成・物性および生体に与える電磁気的影響……………	106
羽田 紘一	
3. ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ…………	121
応用に関する研究	
戸塚 靖則	
4. カーボンナノチューブの生体材料への応用に関する研究……………	145
大森 守	
5. カーボンナノチューブ(CNT)固化体の作製と機械的特性評価……………	169
橋田 俊之	
6. ナノ微粒子の生体材料への応用に関する研究 <i>in vivo</i> での組織反応…………	181
および細胞培養用スキャホールドの開発	
横山 敦郎	
7. 医療用機器利用を目的としたイオン交換膜の長時間高精度電界屈曲…………	215
制御法	
野方 文雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	224

IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の
組織反応性とバイオ応用

主任研究者 亘理 文夫 北海道大学大学院歯学研究科 教授

研究要旨

ナノテクノロジーは材料のナノサイジングにより新たな機能性を産み出し展開しているが、一方でナノパーティクルは人体が生体防御機構の対象として想定してなかった新たな異物であり、組織傷害性もまた昂進する可能性がある。ニッケル微粒子による腫瘍発生などナノ/マイクロ微粒子になると為害性も著しく昂進し典型的なナノトキシコロジー効果を発現する。微粒子のバイオ応用を図るには材料のミクロ/ナノ化により特異的に発現する組織反応性をまず明らかにする必要がある。ヒト好中球、歯根膜細胞、マクロファージ、ゾウリムシほかの各種細胞を用いた機能性試験により細胞生存率、増殖率、LDH、活性酸素、サイトカイン TNF- α , IL-1 β , IL-8, M-CSF 産生を調べ、埋入試験により組織反応の病理学的検索を行った。マクロサイズで生体親和性(bioactive, bioinert)を示すバイオマテリアルでも 100 μ m 以下粒子径が小さくなるほど刺激性は増大し、貪食を誘発する 3 μ m ~ 500nm では最も顕著になりサイトカイン・活性酸素産生等の細胞傷害性、血管拡張・細胞浸潤等の周囲組織への強い炎症を示した。さらに小さな 500nm ~ 50nm になると刺激性はやや低下する傾向を示した。針状粒子は塊状に比べ貪食の有無によらずより強い刺激性を示した。これらはイオン溶出に基づく化学的為害性とは異なる材質に非特異的な物理的サイズ・形状効果である。また 30nm の TiO₂ 強制露曝試験を行うと肺胞を通してナノ微粒子が体内に取込まれた。微粒子サイズ効果による為害性の程度は細胞内毒素の 1/1000 以下と低いが、組織内では貪食を誘発し金属の場合には細胞死を導いて局所に残留し長期炎症を継続する点で注意が必要である。また 50nm 以下になるとマクロファージ等が異物と認識・処理できず、リンパ液や血液に取込まれ全身に拡散し他臓器に影響を及ぼす可能性もある。こうしたナノトキシコロジー問題に対応するためには、in vitro, in vivo 試験の生体反応素過程・局所組織レベルのみでなく、今後、呼吸器系・消

化器系も含めた全身動態レベルでの挙動を把握する必要がある。

最も代表的なナノパーティクルであるカーボンナノチューブ(CNT)については bioinert 材料一般に起きる程度の微粒子刺激性は有するものの、短中期的には発癌性など特異的な生体為害性は認めず、むしろバイオ応用に有利な、細胞・組織に対する特徴的な種々の特性を多数見出した。バイオ用としてサイズ調整した可溶性 CNT および処理性の高いカーボンナノファイバー(CNF)を開発した。ミニブタ由来歯根膜細胞株の増殖に及ぼす影響は骨芽細胞様細胞と線維芽細胞様細胞で作用が異なる細胞特異性を示し、 \varnothing 実験系のゾウリムシのキャピラリー培養では磁性ナノ粒子と異なり CNF を取り込んだ若齢・老化細胞はともに行動や形態に異常は認めなかった。m-RNA の発現、軟組織内の炎症の程度、細胞ライソゾーム内での分解性とも CNF のほうが CNT よりも生体による処理性が高く結晶構造依存性が認められた。バイオ応用として、過飽和度を適度に有する擬似体液への浸漬によるアパタイトのバイオミメティック・コーティング、すぐれた細胞付着性・伸展性を示す細胞増殖用スカフォールド、殺菌等の化学的・薬理的効果によらず物理的吸着により菌数を低減する細菌吸着効果、コラーゲンとの相互作用による歯質の選択吸着を利用したコンポジットレジン/歯質 接着界面マーカー、親水性と分散性に富む CNT ザル内包アルギン酸ビーズによる環境浄化用選択吸着剤および経口投与試験、リポソームへの CNT 組み込み、糖鎖・タンパク質による表面修飾、リガンド・レセプターの特異的結合を利用した遺伝子導入用担体、カーボンナノカプセルの精製を行った。また放電プラズマ焼結法により骨に類似した機械的特性と擬似塑性変形、高い破壊靱性を示す CNT 固化バルク体を作製した。乾式高温合成によるナノアパタイト/CNT、湿式によるナノ炭酸化アパタイト/コラーゲン、厚さ方向にナノ炭酸化アパタイト+コラーゲン/ポリ乳酸の組成を変化させた傾斜機能型 GTR 膜の各ナノコンポジットの開発を行った。放射光による蛍光 XAFS 法から Ni を触媒に用いた CNT では強酸処理後もグラフェンシート中にダイマーとして残留し、チタンインプラント周囲組織の極微量検出 Ti は金属と酸化物の両ケースがあることを見出した。磁性ナノ微粒子の表面磁気異方性のシミュレーション、癌の温熱療法に最適なマグネタイト粒子のサイズ分級、高含水性電解質高分子膜の脱水処理による電気駆動型アクチュエータの屈曲制御性の改善を行った。

本研究で明らかにした物理的サイズ効果による生体為害作用は微粒子の体内分布・動態、炎症や免疫システムへの影響などのナノトキシコロジーの最も基本的な現象であり、ナノテクノロジーが生体へ及ぼす影響を検討する上で必須の知見であり、また CNT のバイオ応用開発はいまだ萌芽的段階であるが、種々の特徴を有し将来の発展性は大きいと考えられる。

分担研究者		
田路 和幸	東北大学大学院工学研究科	教授
橋田 俊之	東北大学大学院工学研究科 附属エネルギー安全科学 国際センター	教授
戸塚 靖則	北海道大学大学院歯学研究科	教授
横山 敦郎	北海道大学医学部歯学部附属病院	講師
野方 文雄	岐阜大学工学部	教授
羽田 紘一	石巻専修大学理工学部	教授

A. 研究目的

I. ナノ/マイクロ微粒子と生体適合性

(1) ナノテクノロジーとナノトキシコロジー

ナノパーティクルの代表的な応用例として現在ドラッグデリバリーシステム(DDS: Drug Delivery System)の開発が産学官で進められているが、これは意図的に血液中に回流させ癌組織等の標的患部に抗癌剤をはじめとする薬剤を選択的に投与しようとするものであり、ナノテクノロジーならではのメリットである。一方で例えば、ある種の化粧品には色調調整や紫外線カットのために 30nm 大の二酸化チタン粒子が含まれている。このレベルの大きさの微粒子は呼気によって肺胞に到達し血液中に溶解して全身を回流し、大きさによって腎臓、肝臓等のフィルター機能にトラップされて濃縮排泄される、あるいはフィルターを通過して脳や心臓など他臓器に到達蓄積することが可能性としてあり得る。これは意図せずして血中を回流する効果であり、ナノパーティクルにして初めて起きてくる現象としてナノトキシコロジーと呼ぶに相当するデメリットである。

ナノテクノロジー開発にあたっては必然的にその新しい機能性というメリットを強調して進

められるのが普通である。しかし一般に材料のマイクロ/ナノサイズ化したことによって化学反応は活発になるから、その為害性、毒性の効果もまた著しくなることは十分に予想されるところである。

(2) ナノトキシコロジー

生体親和性に優れたバイオマテリアルも、人工股関節部のように過酷な生体内環境での使用により摩耗・溶出し、その微粒子やイオンが生体組織の炎症・壊死、インプラントの弛み、全身反応などを起こすことが知られている。

50nm 以下のナノ粒子は肺の細胞をすり抜けて血液やリンパ系に入り込む可能性がある。報告によればナノ微粒子を注入後のラットでは高い確率で肺がんが発症したり、肺組織やリンパ節には 3～6 割多い粒子が侵入・沈着する。

ナノパーティクルは人体が生体防御機構の対象として想定してこなかった新たな異物である。従来の生体防御機構にはかからずに体内に侵入し、影響を及ぼす可能性があり、全身環境中での微粒子の動態は複雑になる可能性があり、未知の部分も多い。

(3) 生体適合性の微粒子サイズ依存性

我々はナノトキシコロジーという概念が欧米から提起されてくる以前から、こうした問題を研究対象に、バイオマテリアルの生体適合性の生化学的手法に基づく評価法の確立とナノ/マイクロ微粒子に対する生体反応性探索、その上に立ったカーボンナノチューブほか微粒子のバイオ応用開発を先行して行ってきた。そして摩耗粉等の微粒子に対する生体反応、作用機序の解明を試み、ナノ/マイクロ微粒子になると、従来知られているマクロな生体反応で支配的な、イオン溶出に基づく化学的効果としての生体為害性とは異なる、物理的なサイズ依存性を有する細胞毒性が顕在化することを報告した。

(4) ナノテクノロジー開発への警鐘

ナノトキシコロジーの問題はナノテクノロジー推進により現れた DDS やカーボンナノチューブ等、現在、開発中で新しい機能性に注目したナノマテリアル、ナノパーティクルの安全性の再検討を迫るものであり、その帰結はカーボンナノチューブ等、日本発の新規機能性材料・技術の重点開発動向の今後を左右する重要課題である。

のみならず、ナノパーティクルは化粧品や薬剤など、従来既に多くの医薬品、健康関連商品に使用されており、国民が日常的に使用する一般大衆商品まで及ぶ点でその影響は特に重大である。

こうした安全性の再検討問題には科学的根拠に基づく対応が求められる。しかしこの点に関し現状では判断に資する具体的な研究はあまり見あたらない。

(5)ナノトキシコロジー問題への対応とバイオ応用開発

ナノテクノロジーやナノマテリアルおよびカーボンナノチューブの危険性の可能性に関する報道の多くは具体的な研究データに基づかないままに議論が進められおり、細胞機能性試験や動物埋入実験による本格的な研究は少ない。

「ナノテクノロジーは新しい機能性を生み出すとともに、新たな毒性の発生源ともなるのか？」—このナノトキシコロジーの問題に回答するためには、①生体に作用する微粒子の2大側面：為害性(ナノトキシコロジー)と高機能性(ナノバイオテクノロジー)の両者を統一的に把握し、②人間の健康への影響について検討した上で、ナノトキシコロジー/安全性条件を提起し、③これら科学的根拠に基づく生体と環境に安全なナノテクノロジー開発指針(案)のもとに、④日本発の代表的ナノマテリアルであるカーボンナノチューブはじめ、ナノパーティクル、ナノコンポジットのバイオ応用展開を図ることが必要である。

(6)本研究の位置づけと目的 ①

—ナノ/マイクロ微粒子、カーボンナノチューブの生体反応性：ナノトキシコロジー検索

ナノトキシコロジーの問題はナノマテリアルの開発の意義と将来性について問題を投げかけ、ますます微粒子の生体反応性とバイオ応用の研究の重要性を認識させることとなった。これに基づき本研究は平成14～15年度と同様、微粒子の生体親和性及びサイズ依存性を解明するために、サイトカイン検出など各種細胞機能性試験の生化学的手法に基づく材料評価法(in vitro)の導入と、in vivo 組織反応性試験を併用し、為害性発現プロセスの解析を行い、生体適合性に及ぼす影響について調べることを第1の目的として研究を行った。

我々は先に微粒子サイズが10 μ m以下になると物理的サイズ効果による刺激性が急激に昂進することを明らかにしたが、平成16年度はこれに加え、新たに生起したナノトキシコロジー問題の評価と判断に関する視点から、さらにサブミクロン以下でどのようなになるのか調べた。また塊状、針状微粒子等の形状依存性の影響を調べ、さらに呼吸器系を通してナノ微粒子が体内に取込まれるかどうか、強制露曝試験を行った。

(7) 本研究の位置づけと目的 ①(続)

—カーボンナノチューブの生体適合性

中でも代表的なナノマテリアルとして、日本で最初に発見されその応用開発が進められているカーボンナノチューブについては、繊維状結晶という肺ガンを引き起こす発ガン性物質としてのアスベストと類似の形態を持つ連想から、同様な毒性と危険性をもつのではないかという指摘がなされている。

我々が既に行った短期的な試験結果の範囲内では、特異的な生体為害性は認められず、むしろ生体材料として有利な生体親和性的性質が多数見出したが、今年度も引続き、中期的生体反応性試験やサブミクロン以下のサイズ依存性、様々なCNT派生体間の差異を検討した。

II. 微粒子のバイオ応用

(8)本研究の位置づけと目的 ②

次に細胞、タンパク質、DNAサイズにおける生体との相互作用に注目し、上記の為害性発現の作用機序を把握した後はナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子を逆に生体に導入し、バイオ応用展開を図ることが本研究事業のもう一つの大きな目的であり、微粒子としてはとりわけCNTに注目して細菌吸着剤、組織再生用スcaffolds、遺伝子導入キャリアー等のバイオ応用開発、またナノアパタイトの機能性を取り込んだ、歯周組織再生用傾斜機能型GTR膜等のナノコンポジットの開発を行った。

B. 研究方法

B1. 微粒子の生体適合性試験

Ti, Fe, Ni(各500nm, 3, 10, 50, 150 μ m), TiO₂(30, 60, 300, 500nm, 2 μ m), ポリ乳酸(1, 13 μ m)

の各種微粒子および CNT および CNF(30nm ~ 2 μ m)CNF(2 μ m)ほか粒度調整を行った微粒子について、ICP 元素分析による溶出試験を行った後、ヒト好中球、歯根膜細胞、マクロファージ、真皮繊維芽細胞、骨芽細胞様細胞、ラット腹腔・肺胞マクロファージ、筋芽細胞、骨芽細胞様細胞、マウス脾臓細胞、ゾウリムシほかの各種細胞を用い、細胞生存率、増殖率、LDH、活性酸素、サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、M-CSF 産生を調べ、埋入試験により組織反応の病理学的検索を行った。バイオ用 CNT として加熱焼却・酸処理による精製高純度化、強酸処理による切断・可溶・分散化・サイズ制御を行い、また糖鎖、アルジネート、HAP による表面修飾を行った。

B 2. その他

その他の研究内容に関する実験方法は 上記、微粒子の生体適合性試験 の詳細も含め、
―― 亘理文夫(主任研究者): 厚生労働科学研究補助金 萌芽の先端医療技術推進研究事業 ナノメディシン分野 平成 15 年度総括・分担研究報告書「ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用」(課題番号: H14-ナノ-021)、2004 ー に記載しており、また後出の各分担研究者、研究協力者の報告書にもあるので、それぞれ参照されたい。

(倫理面への配慮)

in vitro 試験用の細胞は代表的なものについて市販のものを購入、ヒト好中球、ヒト歯根膜由来線維芽細胞を用いた研究は実験に先立ち、北海道大学大学院歯学研究科・歯学部倫理委員会の承認を得て行った。動物実験は事前に関連法規*に従い、研究計画の妥当性について、動物実験倫理問題検討委員会で審議され、承認された後、北海道大学歯学部動物実験に関する指針に基づき行った。また可能なものは in vitro の実験に置き換えられるよう努力した。

関連法規*: 「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号及び平成 11 年法律第 221 号)」及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号)」

C. 研究結果

I. ナノ/マイクロ微粒子、CNT と生体反応、およびナノトキシコロジー問題

C 1. ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性

1.1) 微粒子サイズ依存性

微粒子のバイオ応用を図るには、材料のマイクロ・ナノサイズ化によって特異的に発現する組織反応性をまず明らかにする必要がある。ヒト好中球、歯根膜細胞、マクロファージ、ゾウリムシほかの各種細胞を用いた機能性試験(in vitro)により細胞生存率、増殖率、LDH、活性酸素、サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、M-CSF 産生を調べ、埋入試験(in vivo)により組織反応の病理学的検索を行った。

Ti, Fe, Ni(各 500nm, 3 μ m, 10 μ m, 50 μ m, 150 μ m), TiO₂(30nm, 60nm, 300nm, 500nm, 2 μ m), ポリ乳酸(1 μ m, 13 μ m)の各種微粒子および CNT および CNF(30nm ~ 2 μ m)に対するヒト好中球、歯根膜細胞、ラットマクロファージを用いた細胞機能性試験(in vitro)では、微粒子径が小さくなるほど細胞生存率が低下し、LDH、活性酸素、サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、M-CSF の放出は増加した。特に細胞より小さくなる 10 μ m 以下では貪食を誘発してこれらの傾向は著しく増大し、ナノ領域でも継続した。組織埋入試験(in vivo)でも微粒子サイズが小さくなると炎症性反応が増加し、およそ 100 μ m 以上のチタン粒子は巨視的サイズのインプラントと同様の生体親和性を示すが、50 μ m 以下では刺激性が亢進し、特に 10 μ m 以下になると貪食作用を誘発し、長期間炎症反応を引き起こすサイズ依存性を示した。この微粒子の物理的サイズ依存性に基づく細胞・組織刺激性、傷害性は 3 μ m-500nm の微粒子に対して最も強く、500nm 以下ではむしろ低下した。

1.2) 微粒子形状依存性

大きさ(直径および長軸長さ)が同じ 10 μ m、3 μ m、500nm の塊状および針状 TiO₂ 粒子を用い、細胞機能性試験により微粒子形状の影響を調べた。針状微粒子のほうが有意に細胞生存率が低く、細胞破壊の指標である LDH の漏出量は高くなった。針状粒子に対する TNF- α 産生量は 3 μ m 以下で急激に増加するサイズ依存性を同様に示したが、IL-1 β 産生量は塊状では

サイズ依存性を示したが、針状では貪食が困難な 10 μ m 大の粒子でも産生量が高く刺激性を示した。これは TNF- α の放出は貪食作用に密接に関係しているのに対し、IL-1 β はより全般的な刺激性に関連するという点でよく理解できる。TiO₂ 粒子は bioinert でイオン溶出等の化学的効果はほとんど無視できると考えてよく、材質、サイズが同じでも針状のほうが塊状よりも刺激性が強いという物理的・形状効果が定量的に示された。

1.4) 強制露曝試験

ラットを用いた呼吸器系への強制露曝試験ではナノ粒子は肺胞に達し、Bio-innert な物質でも炎症を惹起し、病理組織像や粒子の追跡から肺胞から血中へのナノ粒子の移行が認められ、呼吸によってそのままリンパ液や血液に取り込まれる可能性が示唆された。

1.5) 長期埋入試験

3 μ m ~ 500nm の微粒子の長期 in vivo 試験では、Ti では炎症細胞による貪食、細胞内集積を繰返し、やがて線維性結合組織で覆われ粒子群として凝集するが、周囲に取りこぼしがあり、炎症は長期間持続した。

Ni 粒子は埋入後すぐに強い反応を惹起し炎症性細胞浸潤を引き起こし、周囲組織は壊死した。イオン溶出がさらに継続するため、壊死層の周囲に強い炎症層も形成され、6ヶ月後には組織に腫瘍の発生を認め遺伝子レベルでの強い傷害が生じた。

Fe では溶出して周囲組織に広範に分布し組織内の分子や生体に沈着した。これらは線維性結合組織で被包化されるが、ナノ粒子やイオンはその障壁を越えて拡散した。Fe は溶出しやすいにもかかわらず、短期的にはイオン溶出による影響は小さいが、長期にわたる組織への残留は重篤な傷害をもたらす可能性も考えられる。

最も代表的なナノパーティクルである CNT については組織内で凝集し貪食像も認めたが、分散した CNT は組織内で確認できなかった。6ヶ月埋入後も、凝集した粒子群間に炎症が継続している部位や被包化して炎症は認めない部位等があるが、強い有害性は認められず、肉芽腫の発生は見られなかった。bioinert 材料一般に起きる程度の微粒子刺激性は有するものの、物理的なサイズ・形状効果、および組織内で凝集

し二次粒子として作用する効果が主であり、範囲は限定的で生体に強い影響を及ぼす所見は観察されず、アスベストに見られるような特異的な生体有害性は短中期的には認められなかった。同一サイズの針状と比較しても炎症性サイトカインの産生レベルは低く傷害性は認めなかった。むしろ生体材料として有利な細胞・組織に対する特徴的な種々の親和性が多数見出された。

II. バイオ用微粒子・CNT の開発と生体適合性

C 2. バイオ用 CNT の開発

CNT は疎水性で凝集しやすく、通常の使用時はバンドルの状態にあり、さらなるバイオ応用のためには可溶・分散性付与、サイズ制御が必要である。加熱焼却・酸処理溶解による精製高純度化後、強酸中で超音波照射して切断、水酸基・カルボキシル基の親水基を付加し、メンブレンフィルターで順次ろ過し、平均長の異なる CNT(670, 545, 220 nm)、CNF(2370, 1160, 590nm)を得て、高分解能透過型電顕を用い合成、単離、形状の確認を行うとともに、バイオ用実験に供した。また太さによる分級も試みた。とりわけハット型ナノファイバー(CNF)は円錐(ハット)形のグラフェンシートが長軸方向に積み重なった結晶構造を取るため、弱いファンデルワールス力で結合しているハット層間は切断されやすく、細胞内に侵入できる大きさに調整可能であり、また表面に未反応基が存在するため親水基を付加しやすく、バイオ用として注目し作製した。

C 3. CNT の生体適合性

3.1) 細胞反応性試験

ヒトマクロファージ系細胞株 THP-1 細胞から、TLR2 遺伝子を RT-PCR 法により pEF6/V5-His TOPO ベクターにクローニングし、NF- κ B 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子(pNF- κ B luciferase reporter plasmid)とともに human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に遺伝子導入し、可溶化 CNT および CNF 懸濁液ならびに 10 倍希釈液で刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、CNT および CNF はマクロファージならびに TLR2 を介した転写因子 NF- κ B の活性化能を

有しないことがわかった。

マウス脾臓細胞を用いた m-RNA の発現検索でも CNF のほうが CNT よりも TNF- α 産生が低く、刺激性にサイズおよび結晶構造依存性が認められた。

3.2) 細胞増殖活性ならびアルカリフォスファターゼに及ぼす影響

不死化したミニプタ由来歯根膜細胞株 (TesPDL) の増殖に及ぼす CNT, CNF の影響を細胞増殖活性(DNA 合成量)、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性で調べると骨芽細胞様細胞と線維芽細胞様細胞では作用が異なり細胞特異性を示した。

C 4 . 単細胞個体(ゾウリムシ)を用いたナノ磁性微粒子、CNT の生体適合性評価

単細胞個体のゾウリムシでの細胞機能探査法として、 μm サイズの微量試料検定可能な実験系 (キャピラリー培養法) を確立し、液相反応法で作製したフェライト系磁性ナノ微粒子と関連の酸化物微粒子(Fe_2O_3 , NiO , NiFe_2O_4 , CoFe_2O_4 , TiO_2)、希ガス中蒸発法による金属微粒子および CNT, CNF について貪食に基づく体内摂取を行わせ、分裂停止期および増殖期細胞ならびに若齢・老化細胞に対する細胞生存率、細胞増殖能を調べた。またマイクロインジェクションによる CNF の細胞への直接注入を行い、増殖期の細胞に対する影響も調べた。 NiFe_2O_4 , CoFe_2O_4 では作製時の焼成条件に依存して強い細胞毒性からきわめて弱いものまで変化した。CNF を取り込んだ細胞は細胞死せず、若齢・老化細胞はともに行動や形態に異常は認めなかった。

NiO と NiFe_2O_4 では濃度が高くなるほど細胞生存率は低下し、細胞増殖に対しても強い増殖阻害効果を示したが、CNT については細胞生存率に特に影響無く、細胞増殖率の低下も限定的であった。

C 5 . CNT の in vivo 組織反応性とその結晶構造依存性

ラット皮下組織に埋入すると肉芽組織に被包されているものの埋入組織に軽微な炎症が観察されるのみで、組織変性、壊死などの強い炎症反応は観察されず、その炎症の程度は

CNT>CNF(1200nm)>CNF(600nm)の順に軽度になり、起炎性にサイズおよび結晶構造依存性が認められた。TEM 観察では多くマクロファージに貪食されライソゾーム内にも認められたが、特に CNF では埋入期間とともにライソゾーム内での断片化と結晶性の低下が進行し、一種の生分解性(biodegradation)が認められた。長さが 100nm オーダーに比べ μm オーダーのほうが、生体による貪食や処理がされにくいこと、結晶学的に断片化されやすい CNF に比べ、分断される可能性の無い CNT のほうが起炎性が高い。CNT の様々な派生体の中でも結晶構造の違いを反映して生分解性や組織反応性(貪食)が異なる可能性が考えられる。

III . CNT 単体のバイオ応用

バイオ応用に関して多くの興味深い性質が見つけ出された。

C 6 . CNT のアパタイト、糖鎖、蛋白質によるバイオ用表面修飾

6.1) アパタイトのバイオミメティック・コーティング

擬似体液に Ti を浸漬すると表面にリン酸カルシウムが析出することが知られているが、CNT でも CNT をコアとしてアパタイト結晶が放射状に析出し、容易に表面修飾が可能であった。

以下の多層 CNT(MWNT)をカルシウムおよびリン酸イオンを含む数種の緩衝液:

- ・擬似唾液/人工体液派生(Revised Simulated Body Fluid: R-SBF)
- ・人工体液/標準(Standard Simulated Body Fluid: SBF)
- ・人工唾液 2 (商品名 Saliveht/ Artificial saliva)
- ・ハンクス溶液(Hanks' Balanced Salt Solution: HBSS)
- ・生理食塩水(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline: PBS)

および、それらに F を添加した溶液に浸漬すると、過飽和度を適度に有する条件下で、CNT を核としてナノサイズのアパタイトがよく析出することが観察された。

析出量は基材に依存し、グラファイト、活性炭等、他の炭素系基質と比較すると、PBS(+)中では直径 30nm の MWNT 上で最も大きかった。

結晶形状は多くフレーク状であるが、F添加すると結晶性が増し針状になる傾向が認められた。

図1は人工体液中(R-SBF)でCNT表面に析出したアパタイト微結晶のSEM像である。針状または板状ナノHAP微結晶がCNTを基点に放射状に成長している。

6.2) 糖鎖、タンパク質の吸着

蛍光ラベル化したラクトース側鎖型ポリスチレンを多層CNT(MWCNT)分散液に加えると、針状形態に沿って蛍光が観察され、表面への糖鎖の吸着が確認され、レクチンとも選択的に結合した。CNFおよびフラーレン(C60)でもMWNTと同様に、糖鎖やアルブミン、コラーゲン等のタンパク質、および人工糖質高分子で容易に修飾できることが明らかとなった。

以上の析出および主として物理吸着によるCNTまたはCNFの表面修飾は、操作が簡便な上に適用できるカーボン基質の適用範囲が広いことバイオ応用研究において様々な場面で有用であると考えられる。

C7. 細胞増殖用スカフォールド：

ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)膜およびポリカーボネート(PC)膜上に吸引し固定したCNTスカフォールド上に播種した骨芽細胞様細胞(Saos2)は培養後、細胞増殖が促進されるとともに、成長した細胞は通常単一方向に伸張するのに対し、全方向に広く伸展した形態を示し(図2)、細胞末端では突起がCNT叢スカフォールド内部まで伸展、嵌入した。CNTと強固に結合するため、トリプシン処理でも剥離が困難であり、CNTはすぐれた細胞付着性・伸展性を示した。

C8. 細菌吸着

CNTと混合、静置後、希釈した上清中の全唾液細菌、S.Mutans, E.Coliをそれぞれ、寒天培地で培養し、コロニー数を計測すると、添加CNT濃度とともに培養上清の透明度が増し、菌数は1/10以下まで減少した。細菌がCNT叢に入り込み、菌体にCNTが絡みついた様子がSEMで観察され、殺菌等の化学的・薬理的効果によらず菌体の物理的吸着により細菌数を低減する効果が認められた。

C9. コンポジットレジン/歯質 接着界面マーカー：コラーゲンとの相互作用による歯質への選択吸着

図3はヒト歯牙をリン酸でエッチングした後の象牙質で、脱灰により残留したコラーゲン線維が象牙細管内を含め一面に見られ、その上にCNTが吸着している様子が観察される。疎水性のCNTはコラーゲンに吸着しやすい特性を持ち、エッチング処理した歯質のうちで、エナメル質に吸着されず、コラーゲン線維が露出した象牙質にのみ選択的に吸着される。このことを利用し、コンポジットレジン修復時に歯質に塗布し、レジン再削合時の過剰な歯質の削合を回避する肉眼認識用レジン/歯質界面マーカーとして応用した。図4は臼歯窩洞内部にCNTマーカーを塗布しコンポジットレジン修復後、再削合した時の断面プロファイルを示したものである。CNTのマーカー効果により、過剰な削合深さは最大120 μ m程度で不要な歯質削合はほとんどない。

C10. 遺伝子導入用担体への応用

リガンド・レセプターの特異的結合を利用した遺伝子導入担体として、インターカレーター付加により発現プラスミドのCNTへの結合とペプチド合成を行い、リン酸カルシウム法による遺伝子導入を試みた。またCNFs/Na-ALG複合体にpCMV b-Gal発現プラスミドを結合し、H1299肺ガン細胞株への輸送に応用した。

C11. 親水性CNT/アルジネートコロイド 11.1) 環境浄化用CNTゾル内包アルギン酸ビーズ

現在までの汚染物質の処理法の多くは、高濃度の汚染物質を対象としたものであり、低濃度の汚染物質の処理には非効率的である。複雑な環境物質から選択的に汚染物質を捕集し、既存の処理法が適用できる濃度まで濃縮できる新規な材料として、1.2%アルギン酸ナトリウムと100ppm多層CNTからなり、親水性と分散性に富むCNT/アルギン酸ナトリウム混合コロイド(CNT or CNFs/Na-ALG)を作製した。次に吸着サイトであるCNTの固定、コロイドや腐食酸類などのサイズの大きい物質からの吸着サ

イトの保護、汚染物質が吸着した CNT と処理水との分離の目的のために、この CNTs/Na-ALG コロイドをアルギン酸ゲルで内包したアルギン酸ビーズ(直径 400 ~ 600 mm)を作製した。

このアルギン酸塩ネット(膜)を通過して内部に拡散できる物質の中で、CNT はベンゼン環をもつ物質と強い親和性を有するため、分子量 1000 程度までの芳香族系有害性物質を選択的に吸着・除去し、CNT と結合しない物質、例えば、水や無機電解質などは CNT に保持されずに、ビーズ(吸着剤)を通過する。この選択捕集・除去能力を利用して、環境中の汚染物質の捕集・除去とともに、CNT 包摂アルギン酸ゲルは生体親和性が高く、将来的には生体内に侵入・存在する有害物質の除去にも使える可能性も考えられる。

11.2) 細胞増殖及び芳香族化合物の吸着への影響

アルギン酸ビーズ内包 CNT 及び活性炭、コントロール(アルギン酸ビーズのみ)の細胞(Balb 3T3)の増殖への影響を MTS 法によりモニターしたところ、コントロールと同様の増殖及び生存を示し、CNT による影響は全く観察されなかった。また芳香族化合物のマイトマイシン C (MMC) を加えた培養液中に混和後、上清液で細胞(Balb c3T3)培養を行い、MMC の吸着効果を評価したが、3 種とも有意差は認められなかった。さらに実験条件を検討する必要がある。

11.3) アルギン酸ビーズによる経口投与試験

CNF が酸性の胃液中で凝集するのを避け、腸から吸収されるように、CNFs/Na-ALG コロイドを内包したアルギン酸塩球状中空カプセルをラットへの経口投与、吸収を介しての血液成分の生化学的試験に応用した。経口投与・体内吸収後の血液検査から毒性は認められなかった。

C 1 2 . リポソームへの CNT 組み込み

リポソームは生体膜のモデルとして生体膜及び膜タンパク質の機能解明に使用され、ドラッグデリバリーシステムの担体としても注目されている。全身麻酔薬の作用機序を調べるために、スピンラベルしたリポソームの電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを測定し、生体膜及

び膜タンパク質に対する全身麻酔薬の作用を推定する研究を進めてきた。本研究では生体膜への CNT,CNF の作用を調べるモデルの作成、およびリポソームの物理的、化学的性質の改善を目的に、スピンラベル剤を組込後、リポソームの電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを測定し物性への影響を評価した。また粒度分布測定装置、あるいは電子顕微鏡によりリポソーム、CNT および CNF のサイズ測定と形状観察を行った。ESR スペクトルから計算されるオーダーパラメーターと回転相関時間から推定されるリポソーム小胞膜の流動性には今回の結果では特に変化は見られなかった。

C 1 3 . カーボンナノカプセルの精製と血管内投与

カーボンナノカプセル(CNC)は希土類炭化物 (CeC_2 など) の周囲をグラフェンシートで覆われた直径 20 ~ 30nm の粒子であり、生体内での造影剤やトレーサーなどへの応用が期待される。ナノカプセル精製時のアモルファスカーボン除去のための大気酸化は MWCNT では 500 °C 程度の高温で行っていたが、CNC では 400 °C 以下の低温で行う必要があることが分かった。Ce 含有カーボンナノカプセルの有害性が低いことを確認後、血管内投与し、体内循環、臓器への濃縮を検知した。

IV . CNT 焼結バルク体の作製と特性評価

C 1 4 . CNT 焼結固化体・コンポジットの作製と特性評価

14.1) 作製と機械的特性評価

CNT のバルク体は軽量不活性で機械的性質に優れると期待されるが、難焼結性である。耐熱性にすぐれた MWCNT に対して結合材として最初にフェノール樹脂、また生体適合性の観点からこれに代えて非晶質 SiC の先駆体であるポリカルボシラン(PCS)を添加し、放電プラズマ焼結(SPS)法を採用することにより、CNT の焼結固化バルク体の作製が可能となった。3 点曲げ試験およびスモールパンチ(SP)試験の機械的特性試験から、密度 $1.7g/cm^3$ 、ヤング率 3-10GPa、ビッカース硬さ H.70 と骨の物性 ($1.6-2.1g/cm^3$, 7-30GPa, H.<60) に近い緻密体であることが確認され、硬組織修復に適当な特

性を備えている。図5は焼結前30% PCSを含有したMWCNT焼結体の3点曲げ試験後の破断面のTEM像で、引抜き変形を受けた直径約30nmのMWCNTの末端が観察されている。CNTは焼結後もチューブ状構造を保持していることが確認され、また表面には粒状物が観察され、SiCである可能性が示唆される。HvはPCS含有量が高いほど増加した

同様に単層CNT(SWCNT)についてもPCS添加およびバインダーレス焼結体を作製した。バインダーレス(SWCNT 固化体では破壊時、繊維状のCNTの引抜き効果による摩擦力のために、クラックが急激には進展せず、断続的な引抜きと局所的な破断を繰返す結果、セラミックスとしてきわめて特異的な擬似塑性変形と高い破壊韌性を示した。

さらに機械的特性の向上を図るために、SWCNTsの構造を大きく損なうことなく、SWCNTs間およびバンドル間に強固な結合を導入することを目的として、PCSを10 mass%添加し、ホットプレス(HP)法による固化体の作製を行った。SWCNT-PCS 固化体では約1500 °C、バインダーレス SWCNT 固化体では約1700 °Cの作製条件にて、骨と類似した弾性率を有する固化体が得られた。SWCNT 固化体は数十本で構成されるバンドルがユニットとして引抜き滑り変形で破断した。PCSを結合材としたSWCNTはPCS濃度の増加とともに強度が増加し、破壊は脆性的になった。

14.2) 生体適合性

ラット腹部皮下埋入試験では線維性結合組織に被包化され、バインダーとして、ポリカルボシランを使用した多層CNT 固化体ではフェノール使用時に比べ起炎性ははるかに低いが、結合材濃度が高いほど炎症性は増加した。

14.3) ナノアパタイト/CNT コンポジット (nHA/CNT)の作製

6モルの $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (=DCPD)と4モルの $\text{Ca}(\text{OH})_2$ の混合粉末の反応により $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [=HAP]を生成させる乾式合成法では、通常大気圧中1200 °Cでの加熱が必要であるが、放電プラズマ法(SPS)の適用により680MPaの圧力下500 °Cの低温でも生成可能となった。

HAPは脆性材料で破壊韌性が約0.7と低く

機械的特性試験用試料作製中でも破損しやすく信頼性に劣る。MWCNTを添加し、焼結圧5-20MPa、焼結温度1200 °C付近でSPSで複合材料を作製すると、ビッカース硬さは低下するものの、4wt%添加で、曲げ強さは1.4倍増加し、ビッカース圧痕法での亀裂伸展長さから求める破壊韌性測定試験では亀裂の発生がほとんど認められなくなり、破壊韌性値は6wt%添加で1.7と2倍以上増加した。

これらの韌性向上効果には屈曲性に富むCNTの亀裂伝播阻止効果、および破壊進展時の強度の大きいCNTの引抜き、破断効果で破壊エネルギーを消費すること等が寄与していると考えられる。またCNT焼結バルク体では引抜き効果により、擬似塑性的破壊挙動を示すが、HAPとの複合体では15wt%添加ではこの性質は現れず、40wt%添加の複合材料で検証中である。

この複合体組織、ナノアパタイト/カーボンナノチューブコンポジット(nHA/CNT)は弱い分子間力で結合されたMWCNTと50nm以下のHAP粒からなり、コラーゲンとともに骨を構成するナノHAP微結晶とサイズと構造が類似していることは興味深い。

V. 顕微鏡観察、スペクトル解析

C15. ナノクラスターキャラクタリゼーション手法の開発、生体内ナノ微粒子の状態分析

放射光を用いたXAFS法によりCNT生成に用いられた金属触媒の合金クラスター構造解析を行った。動径分布関数解析で得られたNi触媒のNi-Ni結合距離と配位数はバルク体と同じことから、10nmを越える金属微粒子として存在しており、強酸によるNi除去処理後も、CNTのグラフェンシート中の欠陥にNi-Niダイマーが強固に結合固定された状態で約100ppm残留していることが蛍光XAFS法と多重散乱法解析から示された。CNTの作製時の触媒としてバイオ用にはNiを用いないことが望ましいと考えられる。

また純チタン製デンタルインプラントに隣接した口腔粘膜組織の放射光によるX線吸収微細構造(XAFS)解析を行い、検出した極微量Tiの状態分析から、金属Ti微粒子とanatase型酸化チタンの両者の場合があることが確認され

た。

ナノ解像度をもつ新しい顕微鏡として、Wien Filter による高エネルギー分解能に加え感度の向上を図り、 μm を切る空間分解能をも併せ持つ光電子顕微鏡(EXPEEM)および表面原子の X 線励起により元素や電荷状態の違いに応じ変化させた原子間力を検知する X 線励起非接触原子間力顕微鏡法(XANAM)の開発を行った。

VI. その他のナノ微粒子、ナノコンポジット、ナノ分子制御高分子ゲル

C 16. ハイパーサーミア (温熱療法) 用磁性ナノ粒子の最適化処理

磁性流体ハイパーサーミア (温熱療法 /Magnetic Fluid Hyperthermia: MFH) は癌患部などに磁性粒子を導入し外部交流磁場を印加することにより、粒子の発熱を引き起こし、加温に敏感な腫瘍細胞を死滅させる癌治療法である。MFH は、1) 外部磁場により目的部位までの誘導が可能、2) 磁性を用いた位置検出が可能、3) 体内深部であっても患部のみの選択加熱が可能、などの利点を持つが、磁性粒子の発熱特性は重要なファクターである。

磁性粒子の発熱に関する理論式から、MFH に最適な磁性粒子は直径 11-13 nm のマグネタイトであり、8 nm 以下の粒子は発熱に寄与しないことを導き、実際にマグネタイトナノ粒子の共沈法による合成後、8nm 以下の粒子を除去するサイズ分級を行った磁性流体では発熱が大きく増加し、最適調整がなされていることが確認された。

また共沈法合成マグネタイトナノ微粒子をセンチネルリンパ節検出剤として用いる医療応用モデル試験を行った。

C 17. ナノ磁性微粒子の生成と物性解析

液相反応法により六方晶系 Mn 置換 Ba フェライト及び La-Co 置換 Sr フェライト等のフェライト系磁性ナノ微粒子、希ガス中蒸発法により金属微粒子を作製し、種々の材質・サイズの微粒子を得た。ナノサイズ化に伴い顕現する特異磁性をメスバウアー分光実験による探索と計算機シミュレーション実験による検証を行った。格子歪導入に伴う歪磁気異方性と単磁区粒子臨

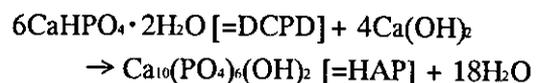
界径の増大効果により高保磁力化を達成した。また計算機シミュレーション実験によりナノ化に伴い顕現化する表面磁気異方性に関する特異磁性を確認した。

C 18. 耐摩耗性窒化チタン/アパタイト傾斜機能型インプラントの開発

インプラントの経年使用で発生する摩耗粉を抑制する対策として、チタンの表面を窒化することにより、硬さ、引っかかり硬さ、耐摩耗性とも約 10 倍増大し耐摩耗性が著しく改善され、動物実験ではバルク体の生体親和性、微粒子の有害性ともチタンとほぼ同等であった。

インプラントの機能性の発現を最適化するために、傾斜機能材料(FGM)の概念を導入し、耐摩耗性窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの開発を行った。デンタルインプラント (人工歯根) の同一製品内において、耐摩耗性・機械的特性を要求するコア部およびアバットメント部(上皮貫通部)に窒化チタンを多く配し、応力緩和・生体親和性を要求する歯根部にはアパタイトを多く配し、各部位間は濃度傾斜させ、界面形成による断絶を引き起こすことなく、物性を連続的に変化させたものである。

図 6 に長さ方向に TiN-20HAP から TiN-80HAP まで組成を 10%ごと変化させ、7 層積層した傾斜機能型インプラント (TiN-20/80HAP)の全体像および各部位の強拡大像(SEM)を示した。混合割合を変えた TiN と HAP の粉末から作製する方法も行ったが、図 6 の試料は HAP の水熱合成：



を乾式で焼結と同時に進行させる方法で作製した。

図 7 は TiN-20/80HAP 傾斜機能型インプラントの HAP 高濃度部からのラマンスペクトルで 3600cm^{-1} 付近の OH-ピークから、 600°C では $\text{Ca}(\text{OH})_2$ が反応後も一部残留しているが 1200°C ではきわめて結晶性の高い HAP が形成されていることが示された。

図 8 は Ti/HAP, TiN/HAP, TiN-20/80HAP 傾斜機能型インプラントの各部位におけるブリネル硬さである。Ti/HAP(850°C 焼結),

TiN/HAP (1200 ° C)に比べ、約 100 前後と十分な硬さに上昇した。動物埋入試験においても Ti/HAP とほぼ同等の良好な骨親和性を示し、かつ TiN によるすぐれた耐摩耗性を具備している。

C 19. ナノコンポジットの作製と評価

19.1) ナノ炭酸化アパタイト/コラーゲン複合体の開発

通常アパタイトは生体中で非吸収性で、骨代替用構造材としてインプラントに使用されるが、50nm 以下のナノ結晶になると生分解性に変化し、生体に吸収されつつ骨再生を促す骨置換性の機能が発現する。新しい骨置換性材料として、骨に類似したナノ炭酸ハイドロキシアパタイト/コラーゲン(nCHAC)複合体を室温にてバイオミメティック方法で調製した。この複合体は天然骨の同様な 2.8-14.7 wt%の炭酸基を含み、低結晶化度の炭酸化アパタイトナノ結晶と気孔形状を有している。TEM 観察により、天然骨の階層構造に類似した直径およそ 4nm の石灰化コラーゲンファイバー束のマイクロ構造が確認され、炭酸濃度により結晶サイズとコラーゲン線維束の構造は変化した。バイオミメティックな組成とマイクロ構造を有する nCHAC 複合体は硬組織治療法に有望であり、さらに機械的特性を改善するために生分解性ポリ乳酸-グリコール酸共重合体で強化した骨置換性ナノコンポジット(nCHAC/PLGA)も作製した。

19.2) 傾斜機能型 GTR 膜の開発

従来、骨や歯周組織の再生に用いられてきた Guided Tissue Regeneration(GTR)膜は全体にわたり組成と構造が均一なままであった。さらに高機能性を付与するために、傾斜機能材料

(FGM) の概念を導入し、ナノ炭酸ハイドロキシアパタイト+コラーゲン/ポリ乳酸-グリコール酸共重合体コンポジット

(nCHAC/PLGA)の組成を変えたシートを積層し、アパタイト含有率を厚さ方向に 0 %

(PLGA のみ) から、最大 5 %まで順次変化させた傾斜機能型 GTR 膜を開発した。図 9 は傾斜機能型 GTR メンブレン膜の概念を模式的に示したもので、ポリマー(PLGA)マトリックス中のナノアパタイト石灰化コラーゲン濃度が下面(PLGA)から上面(nCHAC/PLGA)へ傾斜

的に変化する。図 10 は作製した 3 層構造の傾斜機能型 GTR メンブレン膜の断面像で、上面は nCHAC/PLGA、下面は PLGA 層である。作製した傾斜型三層構造シートは互いに強く接着し、良好な柔軟性を有しており、片面(デンタルインプラント装着時の内面、顎骨側)は多孔質で骨芽細胞等の成長が容易で骨形成を促し、反対面(口腔粘膜側)は平滑で、粘膜細胞等の付着、侵入と骨癒着を防ぐ機能性 GTR 膜となっている。この生分解性複合膜は、nCHAC 添加により、生体適合性に優れ、天然骨と同等の成分とナノ結晶サイズを有し、in vitro では約 8 週付近から分解速度と Ca イオンの放出が増大し、高い骨伝導性を示す。MC3T3-E1 骨芽細胞をこの 3 層複合膜上で培養すると、純 PLGA 膜よりも、良好な反応性を示した。

C 20. ナノ分子構造制御高分子ゲル-医療アクチュエータ用長時間高精度電界屈曲制御法の開発

体内に挿入した際、体組織を傷つける可能性がある従来の医療用カテーテルに比べ、Nafion、PAN ゲル等の含水性電気駆動型電解質高分子膜は材質が生体組織に近く、ヒトにやさしいアクチュエータである。しかし応力緩和による発生力の低下のため持続性に問題があった。含水率が高く数日で劣化する Nafion の表面をドータイト塗布および PMMA 被覆することにより、大気中数週間までの劣化抑制を可能とし、弾性率の向上と発生力の約 6 倍増を達成した。また少量の水分子が膜中に残るように脱水し、発生力の低下を抑制できた。これらの Nafion を利用し、医療用アクチュエータへの応用として心臓や四肢の柔軟な動きを模倣するマイクロポンプを試作した。

また屈曲制御性についても、従来の電気駆動型イオン交換高分子膜アクチュエータでは僅か数分で失われてしまい、持続性に問題があった。銀メッキ Selemion 高含水性電解質高分子イオン交換膜に脱水処理を施すことにより、銀メッキ層の酸化還元反応機構に基づく、数時間を越える長時間高精度電界屈曲制御性を実現した。最大流量 900ml / min に達するポンプを試作した。

D. 考察

D 1. 微粒子と生体反応

(1) 微粒子サイズ依存性 ①

—マクロ～サブミクロン領域

Tiをはじめとするバイオマテリアルに対しても生体反応は、微粒子サイズが小さくなると炎症性反応が増加し貪食を誘発するサイズ依存性を示す。約 100 μm 以上の Ti 粒子は生体親和性を示すが、50 μm 以下では炎症性反応を惹起し、10 μm 以下になると貪食を誘発し、長期間強い炎症を引き起こす。

これはマクロなサイズの試料で通常支配的な、材料の化学的性質に基づきイオン溶出を經由して現れる生体為害性とは異なり、生体親和性を示す材料にも微粒子になると現れる材質非依存的な物理的サイズ依存性を示す細胞毒性である。

mm, cm, m のマクロサイズ領域ではこうした物理的効果は無視できるほど小さい。しかしおよそ 100 μm の臨界径以下になるとサイズ効果、形状効果等の物理的因子が次第に亢進し、細胞大の 10 μm 以下になるときわめて顕著になり、この傾向は μm 以下まで続いている。人工関節の骨頭摺動部に発生する摩耗粉等で典型的に問題になるが、例えば歯科用バーで Ti を切削すると摩耗粉の大きさは 10 μm から 5nm の範囲に分布し、その分布の割合は 5 μm 近傍(60%)、800nm 近傍(30%)、250nm 近傍(7%)、60nm 近傍(3%)のように、いずれも物理的刺激性を惹起するサイズに含まれる。

粒径のほかに、ナノパーティクルでは比表面積が大きい、反応活性度が高い、浮遊しやすい、等の性状が顕著になることから、もともと為害性がある Be, Cd, V, Mn, Ni 等では当然、毒性は強くなる。Ni 微粒子のラット軟組織長期(6ヵ月)埋入試験では3匹中、2匹に腫瘍が発生した。ナノ/マイクロ微粒子になると為害性もまた著しく昂進する典型的なナノトキシコロジー効果の例である。

では生体親和性(bioactive)・生体不活性(bioinert)材料の微粒子ではどのようなになるであろうか。

1) in vitro :

bioactive, bioinert 材料では物理的微粒子刺激性が物質によらず、ほぼ同程度に発生する。本研究の細胞機能性試験で明らかにした結果に

よれば、物理的サイズ効果に起因する細胞刺激性の強さは細胞内毒素に比べれば 1/100 ~ 1/10000 のレベルである。一般にバイオマテリアルは bioinert であるから、影響が細胞のみに限定される in vitro での反応場では、細菌やある種の蛋白質の刺激に比べ、材料のサイズ・形状効果という材質非依存的な物理的刺激はきわめて低く、むしろ微粒子が患者から飛散した場合やあるいはある種の処理をした際には、付着している細菌や蛋白質によって為害性が桁違いに強く現れ、材料からの影響は無視できるほど小さい。

2) in vivo :

しかし問題はそう単純ではなく、単一試験のみでの判断は尚早である。微粒子のナノトキシコロジー効果は細胞レベルから、動物埋入試験の組織レベルになると状況はさらに複雑になる。in vivo でこれらの微粒子を軟組織に埋入すると、炎症性細胞浸潤、毛細血管拡張、貪食誘発等の炎症を引き起こす。

材料によっては細胞に貪食された後、その場に残留するものと血流にのって他臓器へ移送されるものがある。またそのサイズによって臓器で処理されるものとフィルター機能をすり抜けて血中を回流するものがある。それぞれ人体に及ぼす影響が異なり、危険性や予防性・対策もまたそれぞれに質が異なる。

細菌等による内毒性のレベルは桁違いに高く、局所的に顕著な為害性をもたらすものの、多くの場合、回復治癒とともに原因物質は除去され、一過性のイベントとして完了し、またもとの状態に回復する。

しかし Ti, Fe, Ni 等の金属系微粒子ではマクロファージ、好中球等に貪食された後、他の臓器への移送、体外への排出はされずに、細胞死を誘導し、炎症性サイトカインを放出して炎症性細胞浸潤を誘発しながら、局所に残留すること人工関節の骨頭摺動部から発生する摩耗粉のように、局所に原因物質が次々に組織に追加的に注入され、生体組織は経時的に炎症発現要因が増加する一方の状況にさらされるならば、上記のプロセスを繰返し、炎症が長期継続する。こうした状況下で治癒力が低下し、長期的には生体防御機構が対応できなくなる事態になる可能性も考えられ、注意が必要である。良く知ら

れているアスベストによる発癌性は、肺癌が発症するまで20年以上かかると言われている。

我々は先に微粒子サイズが10 μm 以下になると物理的サイズ効果による刺激性が急激に昂進することを明らかにしたが、今年度はさらにサブミクロン以下でどのようになるのか調べた。また塊状、針状微粒子等の形状依存性の影響を調べ、さらに呼吸器系を通してナノ微粒子が体内に取込まれるかどうか、強制露曝試験を行った。

(2) 微粒子サイズ依存性 ②

—サブミクロン以下領域

活性酸素産生能、サイトカイン(TNF- α , IL-1 β)産生量などの細胞機能性試験の各指標は10 μm 以下急激に増加し3 μm ～500nm付近で最高値を示した後、それ以下ではむしろ低下した。そしてそれらの数値はオーダー的にTiO₂, SiO₂, FePt等bioactive, bioinert材料でおおよそ類似していた。例えばCNTでは平均長670nm、540nm、220nmと小さくなるほど、各指標は低下し、刺激性が低下することを意味している。CNTのin vivoでの組織埋入試験でも炎症反応の程度の観点から同様に低下し、in vitro試験と傾向が一致した。

即ち、この材料非特異的、物理的刺激性は3 μm ～500nmにかけて最も強くなり、200nm付近以下ではむしろ減少する。従って微粒子サイズと生体適合性の関係は下記のようにまとめられる。

微粒子サイズ：	生体反応性
>100 μm	：マクロ特性に同じ
100～10 μm	：刺激性
10 μm	：貪食誘発、刺激性・炎症反応
～500nm	著しく昂進
500～50nm	：刺激性減少するも貪食・炎症反応誘発。あるサイズ以下から貪食によらず細胞内に侵入する可能性も考えられる。

(3) 形状依存性

大きさが同じで形状が塊状、針状と異なるTiO₂粒子を用い、細胞機能性試験を行うと細胞生存率、LDHから針状粒子のほうがより強い刺激性を示した。TNF- α 産生ではサイズ依

存性を同様に示し違いが無かったが、IL-1 β では貪食が困難な大きさの粒子でも針状微粒子は産生量が高く刺激性を示した。これはTNF- α の放出は貪食作用に密接に関係しているのに対し、IL-1 β はより全般的な刺激性に関連するということによく理解できる。材質、サイズが同じでも針状のほうが塊状よりも刺激性が強いことが定量的に示された。アスベスト等の針状結晶の特異的有害性の理解につながるものである。

D2. 生体防御機構とナノトキシコロジー

(1) 強制露曝試験

呼吸器系を通してナノ微粒子が体内に取込まれるかどうか、強制露曝試験を行った。

粉塵の人体への影響については、粒径が10 μm 以上では鼻道や上気道で捕捉・排出される、5 μm 以下では肺胞まで到達する、5 μm 以上でも繊維状・針状粒子では肺に到達する可能性がある、また呼吸器粘膜に付着し刺激性を引き起こす、可溶性や親油性の強い粉塵は血中に溶解し全身中毒の原因となる等、主として吸入時のフィルター効果に関する情報が一般的に知られている。

ラットへの強制露曝試験を行うと、30nmのTiO₂粒子は肺胞に多数到達、集積し、肺胞から血管内への移行が確認された。さらに全身のX線走査型分析顕微鏡(XSAM)によるTi元素マッピング像から、肺、膀胱等に移送、濃縮されていることが見出された。こうしたTiO₂ナノ粒子は化粧品などの一般大衆商品に既に広汎に使用されているものであるが、ナノ粒子は呼吸によってそのままリンパ液や血液に取り込まれる可能性が示された。また呼吸器系のほかにも消化器系を通して体内に取り込まれる。

(2) 単一試験による生体反応素過程検索と全身の生体防御機構

nmサイズでの刺激性の減少は一見、都合が良さそうであるが、全身の生体防御機構を考える上で単純に安全性が増すとは短絡的には言えないであろう。刺激性が減少して生体防御機構に認知されず、生体内に侵入できるようになれば、生体防御上、適切かどうかわからないからである。むしろ一部位における炎症反応で影響を限局したほうが、全身にリスクが拡散しないとも考えられる。

軟組織に埋入するとサブマイクロ・ナノ粒子では細胞間隙を通過しやすくなり、組織内での移動や血管内皮細胞の間隙への侵入が起き、広範囲に残留し炎症が継続した。ナノ粒子になると安定化されることなく、生体の防御機能を免れ、細胞の中や血中・リンパへの移行、血流を介しての全身への拡散により、暴露部位以外の臓器に影響を及ぼす可能性もある。

in vitro 試験での結果はいわば生体反応素過程の結果であってすべての基本となるものであり、組織・臓器レベルにもその結果が反映する蓋然性は高いと一般には思われる。しかしナノパーティクルの場合には、人体が生体防御機構の対象として想定してこなかった新たな異物であるため、従来の生体防御機構にはかからずに体内に侵入し、影響を及ぼす可能性があり、全身環境中での微粒子の動態はさらに複雑になる可能性があり、未知の部分も多い。こうしたナノトキシコロジー問題に対応するためには、①生体反応素過程レベル、②局所組織・臓器レベル、③呼吸器系・消化器系も含めた全身動態レベルでの挙動を把握することが必要がある。

(3) ナノ粒子の体内侵入

ミクロン～サブミクロンレベルの粒子状物質は、肺に吸い込まれるとマクロファージなどの免疫細胞に捕食され、炎症を起こす。他に移送されず、その場に残留すると貪食、集積、貪食のループを繰り返して長期慢性的に炎症が継続し、異物処理のために放出される活性酸素、サイトカインなどが自己組織を損傷するおそれがある。微粒子がアスベストのように特殊な形状をしていると、体外排出されずに20数年にわたる滞留の後、肺癌を誘発する場合もある。

大食細胞（マクロファージ）は通常肺に入る異物を処理するが、50nm以下の粒子に対するマクロファージの反応が低下する結果から、50nm以下のナノ粒子に対しては異物除去反応が十分に機能しなくなり、呼吸によってそのままリンパ液や血液に取り込まれ、全身に循環してしまう恐れもある。体内や臓器に蓄積されるのか、排出されるのか、細胞内に侵入しどのような影響を及ぼすのか検討が必要である。

(4) 全身での様々な可能性

in vitro での刺激性が低いという結果は体内下でも同様である蓋然性は高いと考えられるも

の、全身の生体防御機構との関連では生体が想定していなかった異物、体内侵入であり、単一試験、単一部位における組織反応のみでは限定的であり、最終的な結論はくたせない。

多くの bioinert な材料に対する生体反応は細胞内毒素等の強い毒性、抗原抗体反応、非自己血液や臓器などに対する免疫拒否反応などに見られる重篤な急性反応ではなく、刺激性が弱いだけに、生体防御機構に認知されず、捕捉されることなく侵入できてしまう可能性も考えられる。50nm以下のナノ微粒子であると呼吸器系から血中に取り込まれ、血流、リンパ系による全身循環、特定臓器への凝集、フィルター機能による濃縮堆積あるいは尿など体外排出あるいはフィルター網を通過して特定部位に滞留することも可能性として考えられる。

こうしたバイオマテリアルは一般に inert(無反応、不活性)であり、あまり重大な反応を急性には引き起こさない。むしろ影響が現実化するのには長期的な集積と時間経過効果と考えられる。

D 3. ナノトキシコロジー問題に対する対応

本研究で明らかにされた微粒子の物理的なサイズ効果による生体為害作用は、微粒子の体内分布・動態、あるいは炎症や免疫システムへの影響といったナノトキシコロジーの最も基本的な現象であり、ナノテクノロジーが生体へ及ぼす影響を検討する上で必須の知見と考えられる。

(1) ナノトキシコロジー/安全性基準の策定

ナノ粒子の製造と使用はアメリカでもその他のどこでも規制はまったくない。さらに産業界もナノ粒子の製造、使用、廃棄における安全な取り扱いのための規準をなんら規定していない。現在、ナノパーティクルはこうした問題を認知あるいは解明することなく、既に商品として使用されているのである。

ナノテクノロジー開発にあたっては通常その生体への影響は考慮されないままか、無視される場合がほとんどである。一方、ナノトキシコロジーを強調するにあたっては具体的な基礎資料が無いままに倫理的観点からの議論に進みがちである。バイオ応用開発にあたってはこれら微粒子の二大側面：為害性と高機能性の両者を科学的に把握し、環境及び人間の健康への影響

について検討しナノトキシコロジー/安全性条件を見極めた上で開発を進める必要があるだろう。ナノテクノロジーの開発、とりわけバイオ応用開発にあたってはこの問題は一度は検証し、研究開発者のみならず一般国民にも公知の情報として開示する段階が必要になるだろう。

(2) 全身環境下での微粒子動態の組織的分類

生体組織中で貪食を誘発した微粒子は例えば金属チタン(Ti)では細胞死を誘導して貪食による凝集を繰返しながらその場に残留するのに対し、二酸化チタン(TiO₂)では細胞死することなく、挙動が異なる。

微粒子の材質によって、局所に残留するものと細胞・血液とともに全身循環するもの、特定臓器のフィルター作用で臓器に濃縮されるものとフィルターをすり抜けるもの、臓器で濃縮後体外に排泄等処理されるものと臓器に残留するもの、フィルターをすり抜け全身回流する中で特定組織に到達滞留して2次的な障害を引き起こすもの等、体内での動態が異なる可能性がある。

全身レベルでの影響を調べるには貪食の有無、細胞死の有無、体内循環の有無、臓器内蓄積、体内吸収・分解、溶解吸収性等の項目について組織的な検索研究を行って各微粒子の挙動を明らかにして分類し、細胞毒性、生体・環境への危険度・作用、安全性の評価基準の確立を行う必要がある。特にアスベスト等の針状結晶、カーボンナノチューブ等の繊維状・針状微粒子については気管内注入・曝露、長期発癌性試験を行い、系統的な比較検討が望ましい。これらのデータはまた既に商品として使用されているナノパーティクルの健康に及ぼす判断を行う上でも重要である。

(3) ナノトキシコロジー/安全性条件とバイオ応用

こうしたメカニズムが解明できれば、ナノトキシコロジー/安全性条件を認識し、逆に薬物の体内導入過程としてステルス機能を持たせ生体防御機構に捕捉されることなく、ドラッグデリバリーシステム(DDS)など患部へのスムーズな移送に応用できる可能性が生まれてくる。

D 4. CNT の生体反応性

CNT に対する生体反応性を、検査用プロー

ブとして多岐にわたる細胞(in vitro)および軟組織(in vivo)を用い、種々の検査項目について調べた。下記にそれらの種類を示す。

[検査用プローブ細胞・組織]

in vitro :

ヒト好中球
ヒト歯根膜由来線維芽細胞
ヒトマクロファージ THP-1
ヒト由来真皮繊維芽細胞 HF (p17)
ヒト HEK293(human embryonic kidney)
ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 Saos2
H1299 肺ガン細胞
ラット腹腔・肺胞マクロファージ
マウス脾臓細胞(C57BL/6)
マウス筋芽細胞 C2C12 細胞
マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株
MC3T3-E1 細胞
不死化した
ミニブタ由来歯根膜細胞株(TesPDL)
単細胞個体(ゾウリムシ)

in vivo :

ラット皮下軟組織

[検査項目]

in vitro :

細胞生存率、LDH 活性値、活性酸素放出量
サイトカイン放出量(IL-1 ,TNF-)
炎症性サイトカイン IL-1 ,TNF- ,
好中球走化性因子 IL-8
マクロファージ刺激因子 GM-CSF
細胞増殖率
細胞形態
ラット経口投与試験－血液検査・生化学
検査(白血球、グロブリン、...)
ゾウリムシ細胞生存率、細胞増殖率
血管内投与(Ce カーボンナノカプセル)

in vivo :

ラット軟組織病理組織像

主な細胞・組織に対する生体反応性は下記の通りである。

4.1) in vitro