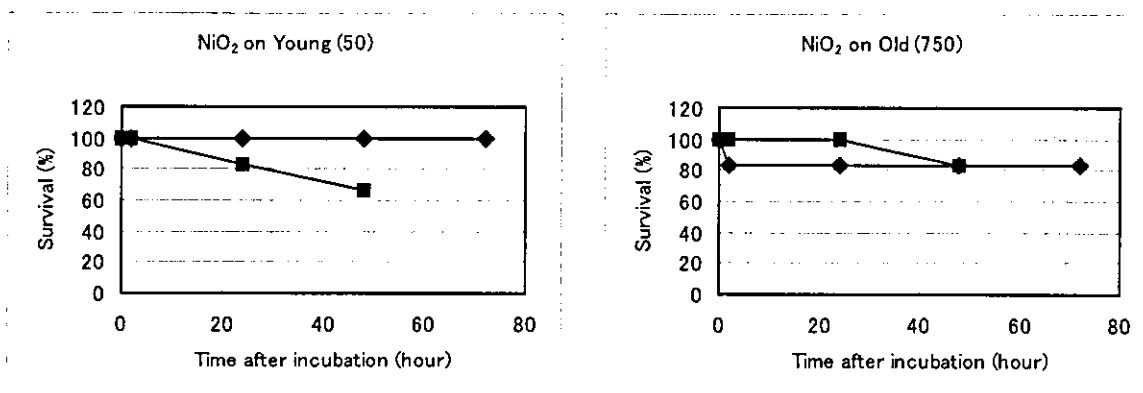


表4 マイクロインジェクションによる CNF の細胞毒性テスト

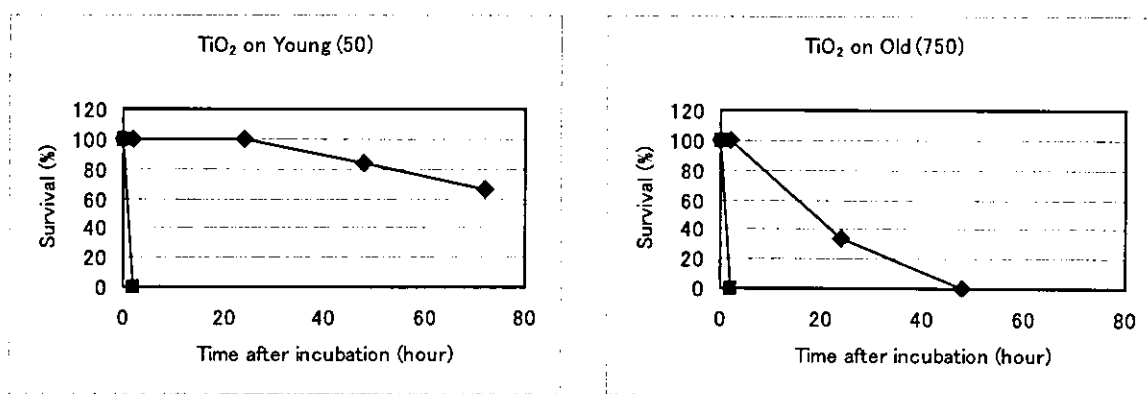
| 細胞 | CNF 注射量 (pg / cell) | Growth rate | | Viability (%) | n |
|------------|----------------------|-------------|------|---------------|---|
| | | Mean ± | S.D. | | |
| Young (50) | コントロール (注射無し) | 3.7 ± 0.5 | | 100 | 6 |
| | 0 | 4.5 ± 0.5 | | 100 | 6 |
| | 0.4 | 3.2 ± 1.3 | | 100 | 6 |
| | 4.0 | 3.8 ± 0.4 | | 100 | 6 |
| Old (750) | コントロール (注射無し) | 3.5 ± 0.5 | | 100 | 6 |
| | 0 | 3.5 ± 0.5 | | 100 | 6 |
| | 0.4 | 3.5 ± 0.5 | | 100 | 6 |
| | 4.0 | 3.6 ± 0.5 | | 100 | 6 |

図6 NiO₂ の細胞毒性テスト



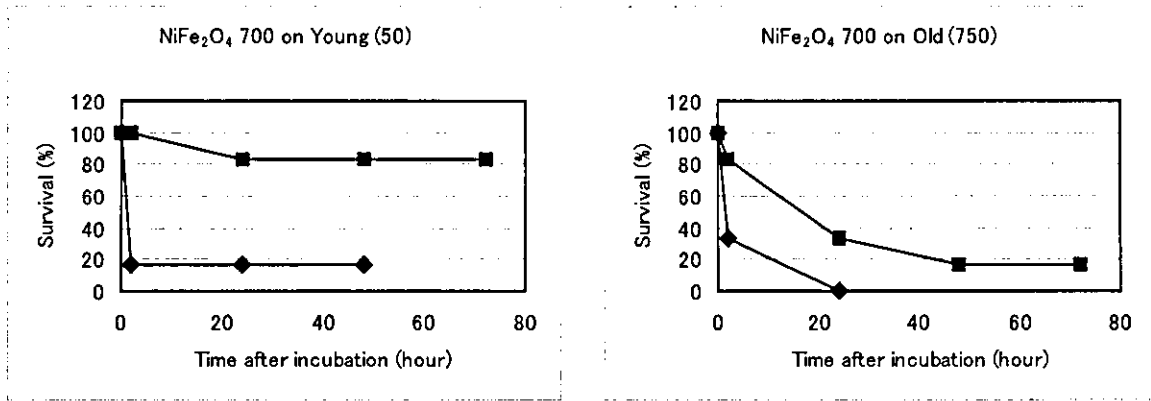
ダイヤモンド : 20 µg/µl、四角 : 2.0 µg/µl

図7 TiO₂ の細胞毒性テスト



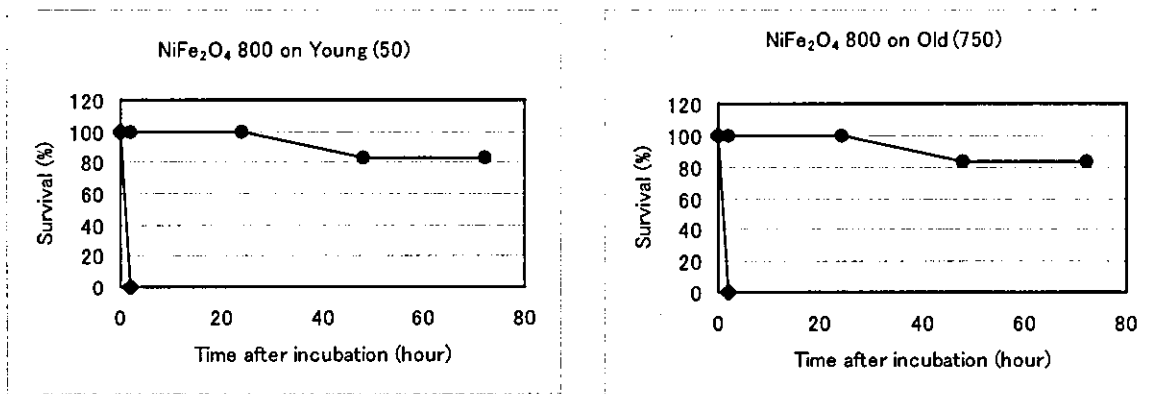
ダイヤモンド : 20 µg/µl、四角 : 2.0 µg/µl

図8 NiFe₂O₄の細胞毒性テスト1



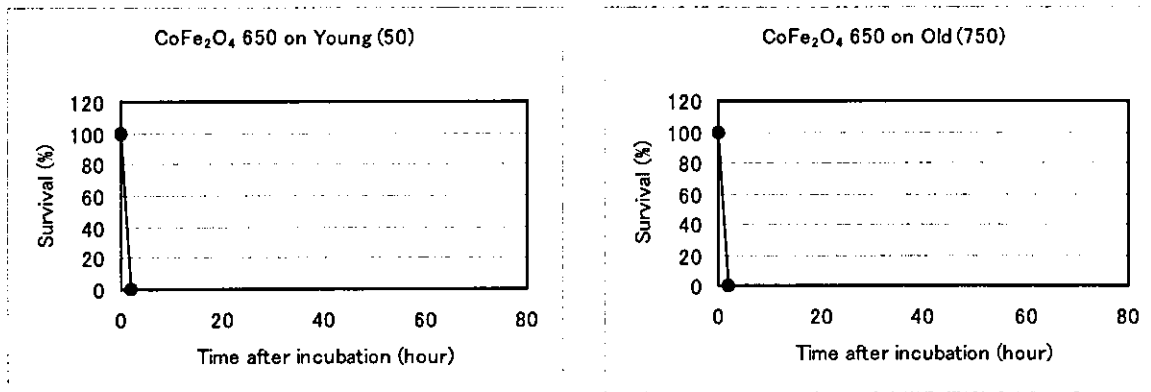
ダイヤモンド : 20 μg/μl, 四角 : 2.0 μg/μl

図9 NiFe₂O₄の細胞毒性テスト2



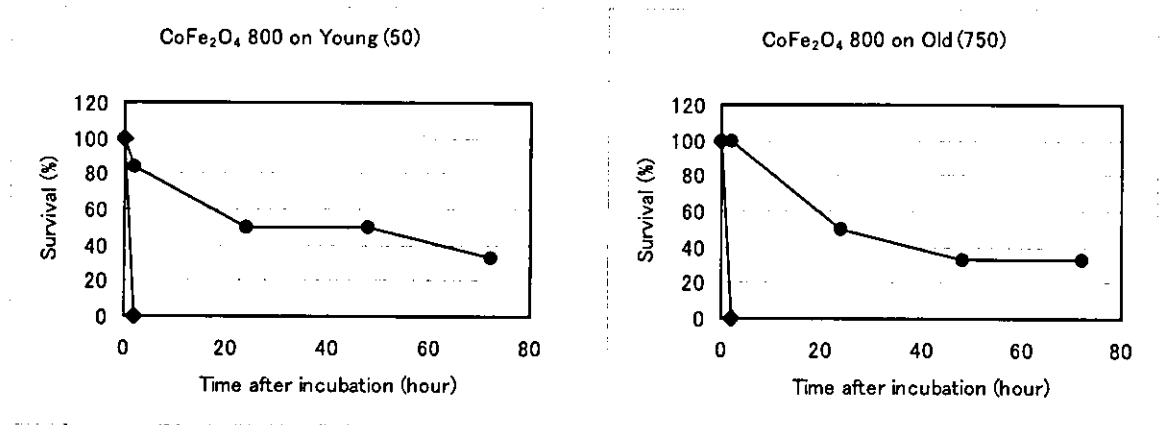
四角 : 2.0 μg/μl, ダイヤモンド : 0.2 μg/μl

図10 CoFe₂O₄の細胞毒性テスト1



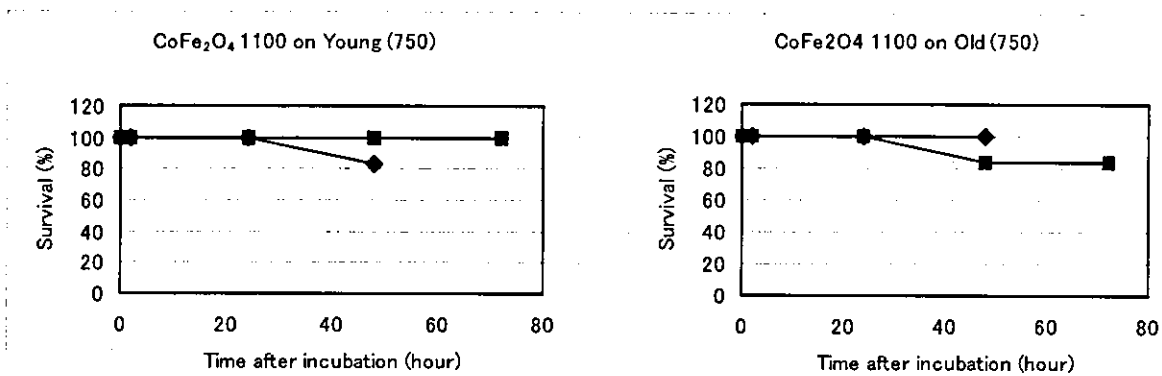
四角 : 2.0 μg/μl, ダイヤモンド : 0.2 μg/μl

図 11 CoFe_2O_4 の細胞毒性テスト 2



四角：2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、ダイヤモンド：0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

図 12 CoFe_2O_4 の細胞毒性テスト 3



ダイヤモンド：20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、四角：2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

図 13 CNF の細胞毒性テスト 1

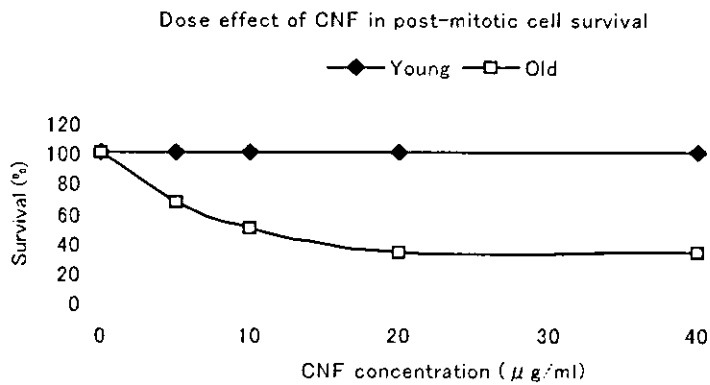


図 14 CNF の細胞毒性テスト 2

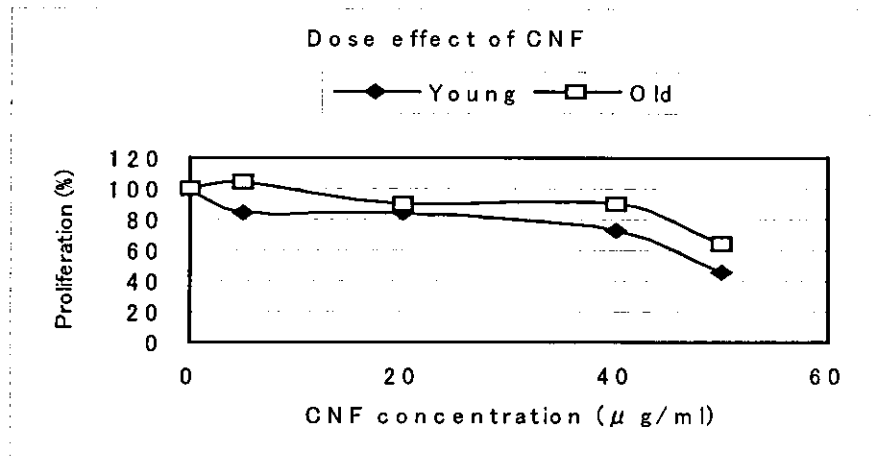
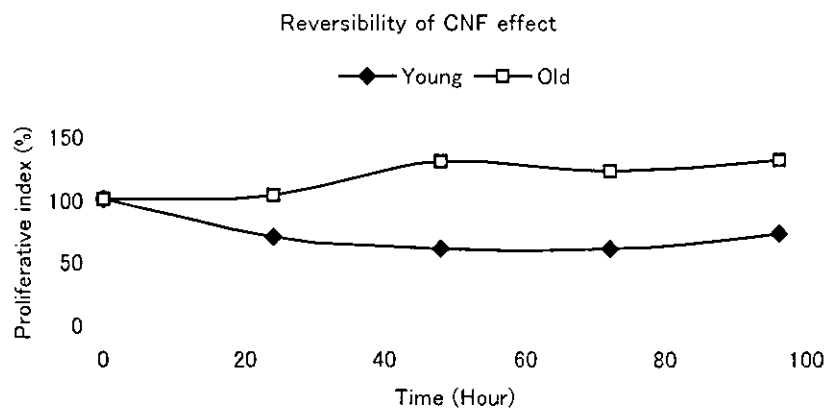


図 15 CNF の細胞毒性テスト 3



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
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に関する研究

分担研究者 戸塚 靖則 北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座教授
研究協力者 高師 則行 北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座助手
田村 一央 北海道大学大学院歯学研究科口腔医学専攻大学院生

研究要旨 一般に生体親和性が優れているとされている生体材料も微粒子の場合には生体親和性が異なることが予想される。しかし、これまで生体材料のナノ・マイクロ微粒子が、生体にどのような影響を及ぼすかについては、まだ十分に検討されていない。今回われわれは、様々なナノ・マイクロ微粒子の生体親和性と細胞為害性の発現の機序について検討を行った。ラットを用いた動物実験と生細胞を用いた細胞機能試験から $3\mu\text{m}$ - 500nm の微粒子に対して最も周囲組織の反応を認めた一般に生体親和性が高いとされている生体材料でも $10\mu\text{m}$ 未満の微粒子の場合は、細胞に対して炎症反応を惹起させることが認められた。そこで、微粒子のサイズと材質と形状による影響を調べ、微粒子の物理的な細胞為害作用を検討した。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。

A. 研究目的

ナノテクノロジーは物質を構成する分子の直径が数 nm、原子の直径が 0.1nm であることから、分子や原子に直接作用して操作することになる。これらの物質は、電子や医療を含む、様々な市場に応用可能であると考えられている。その潜在市場は、近年に 2500 億米ドルに膨らむと言われている。米国では、1999 年にクリントン大統領が年頭教書で発表した科学技術政策では、

ナノバイオはナノテクの主要テーマのひとつと位置づけ、米国の主要大学で分野融合を伴った大規模なナノバイオ研究を推進し現政権もこの政策を継続している。一方我が国では、ナノバイオを標榜している研究機関・プロジェクトはあるものの、実際には材料系あるいは生物系に偏った研究体制がほとんどであり、真の意味でナノバイオ分野の研究はまだ少ない。ナノテクとバイオの両分野に精通した研究・技術

は、今日および将来のナノバイオ分野の重要性にも関わらず、我が国では稀有な存在であり、従ってその社会的ニーズは高いといえる。我々の実験グループは、基礎だけでなく、応用も視野にいたした 実践的研究・技術であり、急速かつ戦略的な産業競争力強化が求められるナノバイオ分野における研究水準の早期向上に寄与すると期待できると考えられる。

一方でナノテクノロジーの研究開発については、そのプラス面ばかりが強調されているが、ナノ・マイクロ微粒子が健康に及ぼす影響も検討する必要がある。ナノ微粒子を注入後のがん発生率を調査からはナノ微小粒子を多く与えたラットに高い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・沈着するという報告がなされ、未対策である超微小粒子の健康への悪影響の可能性が示された。50nm 以下のものは「ナノ粒子」と呼ばれる。肺の細胞をすり抜けて血液やリンパ系に入り込むことから、一部の研究者からは危険視されつつある。また、生体親和性に優れ医療分野で広く応用されているバイオマテリアルも、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。

ナノバイオ技術は、疾病の治療や予防にあるいは人間によって消費される製品に使用される時、人間の健康への影響に留意する必要がある。医学診断でのナノ粒子の潜在的な毒性のような、人間の安全や健康へのナノバイオ技術によって提起される危険性に対して高まっている懸念は、潜在的にコストのかかる安全性 試験、規則および標準枠

組みの導入を通じてこの分野の開発を遅くするだろう。したがって、有益なナノバイオ技術を得ようするためにナノ微粒子に対する基本的な生体反応を把握する必要がある。我々はナノ材料の人間の健康へ関連した危険性を評価してきた。健康問題に関するナノトキシコロジーの基盤研究は、ナノバイオの応用技術と同様に重要である。

我々はナノトキシコロジーの研究を進める上で、ナノ・マイクロ微粒子が *in vitro* でヒト培養細胞（好中球・マクロファージ）を用いて評価する方法を確立し、さらに動物体内への擬似摩耗粉を埋入し、*in vivo* での微粒子の経時的な生体毒性評価を進めてきた。本研究では、材質・粒子サイズの違いが、微粒子化した材料の組織為害作用に与える影響を病理学的・生化学的に検討することを目的とした。今後も幅広い分野でナノ物質・材料が使われることが予想されるとき、ナノ粒子が持つ特異な機能の発見や応用研究と同時に環境や健康に与える影響についても基盤情報としてデータを蓄積、公開していく必要がある本研究報告ではナノ粒子やその他微粒子の健康影響研究の現状について報告する。

B. 研究方法

研究の進め方に関しては、動態解明と影響評価の関連性について緻密な連係を保つべき、*in vivo* の動物実験で調査しているような成分・組成、サイズ、時間の研究と *in vitro* の細胞実験をどのように関係づけるのかを明確にすべき。また、生体親和性の高いチタンのようなバイオマテリアルからスタートした研究の進め方とカーボン新素材に対する影響のメカニズムと応用に関する研

究の進め方と重ねあわせる、あるいは区別することが必要である。我々の分担する研究は影響評価に力点を置き、問題を絞り込んだ。

材料

様々なナノ・マイクロ微粒子として、金属はチタン、鉄、ニッケル、金、銀、白金、パラジウム、コバルトなどとそれらの酸化物を対象とし、ポリマーとしてはポリ乳酸、ポリメタクリレートやポリエチレンなどの微粒子を作製し実験に用いた。また、低浸襲の医療応用が期待されるカーボンナノ新素材も使用した。

これらは遠沈、フィルターや濃度勾配などで平均粒径をそろえ、サイズに依存した生体の影響・反応の違いを調べた。(Fig.1-3) 粒子は粒子数を調整した後、生理食塩水中に分散させた。通常ではナノ・マイクロ粒子は水溶液中で凝集してしまい、二次粒子を形成する。今回は分散剤としてバイオサーファクタント(BS)を用いた。BSは、微生物によって作り出される界面活性物質であり、優れた界面活性作用を示すばかりでなく、従来の合成界面活性剤には見られない数々のユニークな特性を持つ。BSの中には、合成界面活性剤や他の分散剤に比べ、1)低濃度で大きな界面活性、2)緩やかで持続的な作用、3)優れた分子配向性(液晶形成)、4)高度な生理活性、5)生体親和性を発揮するものが多い。BSには、糖型、アミノ酸型、高分子型などが知られている。特に、糖型の我々が生体応用を目指しているカーボンナノ新素材と親和性が高く(赤坂司の研究報告参照)、また、糖鎖に由来する生化学的機能が期待できる。

これらをサンプルに生体に対しての微粒子サイズの影響や各材料の微粒子

の影響を実験した。試料として金属(チタン・ニッケル・鉄)、セラミックス(二酸化チタン)、カーボンナノチューブ(CNT)の各微粒子を用いた。それぞれの微粒子を50nmから150nmまでの各種サイズに調整した。カーボンナノチューブ(CNT)、カーボンナノファイバー(CNF)とカーボンナノカプセル(CNC)は多層カーボンナノチューブ(CNT): NanoLab社製の純度80%の製品を東北大学大学院工学研究科田路研究室で加工したものをを用いた。これらは田路研究室独特の方法を用い、切断、精製して大きさを統一した。(佐藤義倫の研究参照)コントロールとしてBS、各粒子を培地中に入れ、1週間インキュベーター内に置いた後、ICPでイオン溶出量を測定した。

1.in vitro で各微粒子とヒトまたはラットの生細胞を重量比もしくは粒子数/細胞数を同一にして混和し、生存率・LDH活性・サイトカイン産生量・活性酸素産生量を測定し、細胞の形態変化をSEM(電子顕微鏡)で観察した。また、生細胞が反応する臨界寸法を測定することを目的とし、CNTを用い同様な生化学的アッセイを行った。

2.in vitro での反応と比較するため、in vivo でラット皮下埋入試験を行い、経時的な周囲組織の変化を病理組織学的に検討した。

ラット

in vivo の実験には6-10週齢雄性ウィスター系ラットを用いた。平均体重は250gで搬入されてから1ヶ月たった健康なラットのみを用いた。

倫理面への配慮

施設では、動物実験倫理を高い水準で維持するため、ここで実施されるすべ

ての実験の倫理面を厳しく規制している。関連法規*に従い、すべての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）」

本研究の動物実験は、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、*in vitro*の実験に置き換えられるよう努力した。

細胞

ヒト歯根膜由来線維芽細胞

実験に先立ち、北海道大学歯学部の倫理委員会に承認を受けた。歯学部附属病院において、矯正治療に伴う便宜抜歯を受ける14才から22才の患者と家族の同意を得て、抜去された第1小白歯の歯根膜細胞を採取した。歯根膜細胞はPSN1%,FBS10%添加 α -MEMを用い、37°C5%CO₂の条件で培養した。実験には対数増殖期の細胞を3000cells/100 μ lに調整して用いた。

ヒト好中球

ヒト好中球は健常ヒトから採血したあと、通法に従い、6%ヒドロキシエチルデンプン加生食水とFicoll-hypaqueを用い分離し、生理食塩水で洗浄し用いた。その好中球に各微粒子の試料を混和し、37°Cで30分間インキュベートしたものを検体とした。実験には細胞を10⁶cells/ μ lに調整して用いた。

ラット腹腔・肺胞マクロファージ

6週齢雄性ウイスター系ラットの腹腔内に10ccの1%ホルボールミスチン酸アセテート生理食塩水を注入しマクロファージを浸出させたあと、開腹し生理食塩水ごとマクロファージを集め、他血液成分を除去したのちPSN1%,FBS無添加 α -MEMを用い、37°C5%CO₂の条件で培養した。

肺胞マクロファージはラットの気管切開を行い7ccの生理食塩水を肺に送り込み何回か表面を洗い流して全量回収して分離調整した。

実験にはマクロファージを10⁴cells/ μ lに調整して用いた。

凝集の阻害

カーボン新素材により細胞が凝集するためAccutase[®]を加えて、粒子・細胞が凝集しにくくした。Accutase[®]は、培養中の接着細胞を穏やかかつ効果的に剥離するために開発された、細胞剥離液で、哺乳類もしくは細菌由来の物質を含まないため実験系にはほとんど影響しない。

方法

*in vivo*の実験では、ラットの皮下に埋入した各微粒子を、周囲軟組織を含めて摘出し、病理組織学的に検索した。Pentobarbital Sodiumの腹腔内注射による全身麻酔を行った8~10週齢雄性ウイスター系ラットの腹部に切開を加え皮下にポケットを形成し、試料を埋入、縫合した。埋入後、試料については1および4週後にPentobarbital Sodiumによる全身麻酔後、灌流固定を行い周囲組織とともに摘出し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて観察した。長期症例としては1年および1年6ヶ月後に周囲組織とともに摘出し、浸漬固定を行い、光学顕微鏡にて観察した。

in vitro の実験には、ラットマクロファージ、ヒト好中球およびヒト歯根膜由来線維芽細胞に各金属微粒子の試料を混和し、生存率、増殖率、活性酸素産生量、サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-8, GM-CSF) 産生量を計測した。以下に手法を示す。

細胞機能試験

①細胞生存率

1. 粒径の歯根膜細胞増殖率への影響

各粒子の試料の総表面積を $2.5 \times 10^2 \text{ mm}^2$ となるように調整した。試料混和 24 時間後、PBS で洗浄し、 α -MEM と Cell counting Kit (同仁化学研究所) を加え、インキュベーターで 3 時間反応させた。発色後、マイクロプレートリーダーを用い測定波長 405nm で吸光度を測定し、細胞数を計算した。

2. 粒径と粒子濃度の歯根膜細胞増殖への影響

細胞増殖への影響を調べるために、0.5, 3, 10 μm の各チタン試料の粒子数と細胞数が 1:100, 1:10, 1:1 となるよう調整し散布した。1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 時間後に Cell counting Kit を用い、1. と同様の方法で細胞数を測定し、増殖率を比較した。

3. 細胞生存率の算定

各検体をトリパンブルーで染色し、色素排除法にて光学顕微鏡下で好中球・マクロファージの生細胞数をカウントした。また Calcein-AM は細胞内エステラーゼにより Calcein に加水分解され、黄緑色の強い蛍光 ($\lambda_{\text{ex}}=490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=515 \text{ nm}$) を発する。この時の蛍光強度が細胞内エステラーゼ活性に比例することから、生じた Calcein の蛍光を測

定することで、生細胞数を測定することができる。また、Cell Counting Kit は高感度かつ迅速な測定が可能であり、試薬添加後、30 分～60 分発色させることにより、テトラゾリウム塩を用いた比色法の限界とされている低細胞数域、リンパ球などの浮遊性細胞においても 50 cells/well 以上で良好な直線が得られるため、マクロファージ等でも正確に測定できた。

4. 乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性値の測定

各検体を乳酸基質・ジアホラーゼ法にて LDH 活性値を測定した。

②活性酸素産生量の測定

チトクローム C 還元法で、各検体を PMA (ホルボールミリスチン酸アセテート) で刺激して二波長分光光度計を用い好中球から産生された活性酸素産生量を測定した。

③サイトカインの測定

歯根膜細胞播種 2 時間後に、上清を採取し、ELISA 法でサイトカイン (TNF- α , IL-8, GM-CSF など) 量を測定した。細胞播種 2 時間後 ELISA 法により線維芽細胞・好中球・マクロファージから放出されたサイトカイン産生量を測定した。

④細胞形態観察

経時的に反応している細胞を光学顕微鏡と SEM/TEM を使い観察した。

C. 研究結果

～チタン微粒子に対する生体反応のサイズ依存性～

チタンは金属中、最も生体親和性に富むとされ、多くの生体材料に使用さ

れている。欠点としてヤング率が低い、耐摩耗性に劣ることが挙げられる。人工関節等の医用インプラントにおいても、純チタンでは骨頭摺動部で発生した微細な摩耗粉が為害性を惹起する。(Fig.4) 我々の研究ではマクロなインプラントの生体親和性に対し、ミクロな微粒子は為害性を示す事を細胞の反応から明らかにした。摩耗粉の生体為害性の発現には様々な要因があると考えられる。バイオマテリアルのナノ・マイクロ微粒子の組織障害作用に影響する粒径効果を検討し、微粒子の為害性発現の機序の解明を目的とした。培養液中のチタンのイオン溶出量は ICP(誘導プラズマイオン質量分析装置)の測定限界以下であり、化学的効果は無視できた。(Fig.5) *in vitro* で 3mm のチタン微粒子に対し細胞は著名なサイトカインの産生を認めた。(Fig.6) 一方、10mm 以上のチタン微粒子に対しては細胞の反応は低下した。50mm 以上のチタン粒子は線維性結合組織で覆われマクロのチタンインプラントに近い反応で、*in vivo* でもサイズ依存性を示し *in vitro* の実験結果と良い相関を示した。生体親和性の高いチタンも 3mm の粒子になると細胞に取り込まれ、炎症やサイトカインの放出の原因となりうる事が示唆された。

～*in vivo* でのナノ・マイクロ微粒子に対する組織の反応～

in vivo のラットを用いた実験ではナノ粒子に曝露した場合、それが肺胞に届き Bio-innert な物質でも炎症を惹起することが確認できた。(Fig.7) 病理組織像や粒子の追跡からは肺胞から血中へのナノ粒子の移行が認められた。(Fig.8) 皮下組織への埋入実験の結果から微粒子の組織への影響にはサイズ依

存性があることが示された。10mm 粒子は貪食されず組織で分散しないが、3mm 粒子は分散し貪食像を認めた。炎症は 3mm 粒子に対して強く、*in vitro* の細胞実験を支持する結果が得られた。ナノレベルの CNT・二酸化チタンを皮下組織に埋入した場合もマイクロ粒子と同様に、周囲組織には血管拡張・細胞浸潤が観察され、炎症を惹起したが、3mm-500nm の粒子に比べ炎症の程度は低かった。CNT の一部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。(Fig.9) ナノ粒子も生体内で炎症を引き起こすことが明らかになった。

～*in vitro* でのナノ・マイクロ微粒子に対する細胞の反応～

in vitro でのマイクロ微粒子に対する細胞反応にはサイズ依存性が認められ、細胞に取り込まれる 3mm-500nm では最大の反応を示した。生体内不活性の二酸化チタンもこの範囲ではチタン粒子と同様の傾向を示した。サブマイクロの粒子に対して、炎症性サイトカインや活性酸素の放出を検出し(Fig9,10)、細胞表面性状の変化、粒子の貪食を認めた。(Fig.11) また、短期の細胞機能性試験では一般に化学的影響が強く、粒子サイズなどの物理的影響が副次的に出る。チタンのように化学的影響がほとんどないものは粒子の物理的影響による細胞為害作用が明らかになる。

～微粒子の細胞為害作用の材質依存性とサイズ依存性～

培養液中のニッケルと鉄のイオン溶出量を ICP で計測したところ、鉄はニッケルの 4-5 倍の溶出し、どちらの粒子もサイズが小さいほど表面積が大きくなるため溶出速度が増加した。(Fig.5)

ニッケル微粒子は溶出イオンによる細胞膜障害作用が強く、細胞生存率は有意に減少した。(Fig.13) ニッケル粒子の組織為害作用は主としてイオン溶出による化学的為害作用で微粒子の表面積の増加や物理的サイズ効果は副次的なものであった。一方、鉄微粒子のイオン溶出量はニッケルより大きいにもかかわらず、溶出が無視できるチタン粒子とほぼ同等なサイズ依存性を示した。鉄イオンは生体に対し毒性が少ないため、同じサイズの鉄とチタンの粒子に対する細胞のサイトカイン・活性酸素の放出量はほぼ同じになった。(Fig9,10) 鉄微粒子の為害作用は材料非特異的な物理的サイズ効果が主であったと考えられる。

～形状依存性とサイズ依存性～

サイズだけでなく、形状に対する反応を調べるため化学的影響のほとんどない二酸化チタンの塊状粒子と針状粒子を用いた。(Fig.14) 二酸化チタンの針状粒子は同サイズの球状粒子に比べると為害性が強く、LDH の漏出量は有意に高かった。針状粒子に対する TNF- α 産生量はサイズ依存性が顕著で、粒子サイズが小さいほど有意に高い値を示した。一方、針状粒子に対する IL-1 β 産生量はサイズによらず、球状粒子に比べ有意に高い値を示した。(Fig15,16)

～長期間にわたる *n vivo* でのナノ・マイクロ微粒子埋入に対する組織の反応～

材質による影響は粒子が小さくなることで表面積が大きくなり為害性が強く出る。短期的にも組織に影響を与えた。(Fig.17) また、長期に及んだ場合その反応がどうなるか調べた。

チタンは組織内で線維によって被包化された。イオン溶出はほとんどないため組織内で安定化された。3mm 以下の粒子は組織内で炎症細胞により貪食され、細胞内で集積を繰り返していた。また、線維成分が全体を覆い、その収縮で異物は組織内でさらに凝集すると考えられた。結果、貪食されない大きな粒子は線維による被包化を早くから受ける。生体に安定な存在となるマクロのインプラントと同じ線維化がすすみ安定な状態となる。一方で細胞より小さいチタン粒子に対しては粒子群を広く覆う線維による境界が作られるが、500nm-3mm の粒子の物理的な刺激のため炎症は長期間持続した。(Fig.18)

ニッケルイオンは細胞毒性を持つため、イオン溶出する単独の金属として用いられないが、触媒として含まれるニッケルの影響を考慮する必要がある。ニッケル粒子埋入後生体はすぐに強い反応を示し炎症性細胞浸潤を認めた。しかしイオンにより細胞は死滅するため周囲組織は壊死層になる。イオン溶出が継続するため、壊死層の周囲に強い炎症層を認める。6ヶ月後には組織に腫瘍を認め遺伝子レベルでの強い傷害が生じることが明らかになった。(Fig.19)

短期的にはイオン溶出による影響が小さい鉄粒子ではある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が示唆された。粒子から溶出したイオンは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。その結果細胞・組織の活動に影響し、機能障害を起こす。粒子やイオンを含む組織を線維によって被包する反応が生じるがナノ粒子やイオンはその障壁を越えて拡散していた。(Fig.20)

化学的な影響のない bio-inert な CNT

には物理的なサイズと形状が組織為害作用に影響を与える。

また、組織内で凝集することによる二次粒子がサブマイクロ～マイクロサイズとなりチタンの同サイズに似た反応を示した。このサイズは線維による粒子の被包化は個々の粒子で起こりにくいそのため粒子の物理的な刺激が長期にわたり継続する可能性がある。しかしながら範囲は限定的で生体に強い影響を及ぼす所見はなかった。(Fig.21)

～ナノ粒子に対する反応～

一般に材料の組織障害作用は、細胞毒性を持つイオンの溶出による材料特異的な化学的影響が大きい。しかし、ほとんどイオン溶出しないバイオマテリアルも微粒子となると、マクロの材料とは異なり生体為害性を示した。数十ナノ以下の微粒子になると材料非特異的な物理的サイズ効果が重要になる。細胞はナノ微粒子の刺激を受け活性化する。in vitro でマクロファージや好中球は 50nm までの微粒子に反応してサイトカインを放出した。しかし、その反応は貪食が最も盛んな 3 μ m \sim 500nm に比べ有意に低い値を示した。(Fig.22,23)

D. 考察

ナノ・マイクロレベルの粒子は体内動態や生体の反応が従来までのマイクロレベルの粒子とは異なるのは我々も指摘してきた。ナノ粒子を製造する職場の労働者の健康や環境への影響だけでなく、身近な日用品にも用いられ始めたナノ粒子に接する多くの人々の安全の確保には実用化の前に十分な危険性の評価を行うことも重要と考える。ナノ粒子やナノチューブには、強い酸化力があるものや細胞膜を通過しやす

いものがあり、生体や環境への影響が大きくなる可能性がある。また、粒子の形状によっては肺がんの原因になるアスベストに似た毒性を持つ懸念もある。環境に放出されるナノ粒子などの量が今後増えると予想される一方で、健康や環境への影響の研究が遅れていることに言及したい。ナノテクノロジー（超微細技術）の産業化で最先端を走る日本でも、影響評価を求める声が強まっている。我々の研究結果はその問題に対する基礎的なデータを示していると思われる。今年度の実験からは粒子の改良、実験系の改善により様々な基礎的なデータをとることが出来た。

動物実験は今後の詳細は短期での指標を探る上で役立つものであった。50 μ m 以上のチタン粒子に対しては急性の炎症症状も穏やかで、長期的には線維性結合組織で覆われ安定した。一方、3 μ m 以下の粒子に対しては強い炎症反応が生じ、長期間反応が持続した。実験から 50 μ m 以上のチタン粒子で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、10 μ m 以下の粒子では炎症反応を惹起し、長期間にわたり強い炎症反応を引き起こすことが示唆された。ICP 元素分析から、チタン微粒子からのイオン溶出は認められなかったため、溶解イオンとしての化学的効果とは異なる、微粒子の物理的サイズ効果として細胞毒性を示すことが示された。6ヶ月、1年では実験から長期にわたる反応が短期間の細胞の反応と異なる可能性が示唆された。呼吸器曝露は健康影響評価に濃度と曝露時間の関係についての測定が必要である。動物の循環系器官への影響評価にはほぼ限定したが、全身循環の可能性も考えられた。さらに排出に関する検討が必要である。

生細胞を使った生化学的アッセイにおいて $3\mu\text{m}$ 以下の微粒子に対し、サイトカイン・活性酸素が有意に検出され、光学・電子顕微鏡による観察では、 $3\mu\text{m}$ 以下のチタン微粒子の貪食が認められた。一方、 $10\mu\text{m}$ 以上の微粒子に対しては細胞の著名な反応は認められなかった。生体親和性の高い他のバイオマテリアルも同様にサイズ効果が現れることが予想され、各種材料を用い実験した。細胞生存率およびLDH活性値から、 $10\mu\text{m}$ 未満の微粒子は細胞毒性が高く、活性酸素産生量、サイトカイン放出量から $10\mu\text{m}$ 未満の微粒子に対して細胞は炎症反応を強く起こしていることが示唆された。これは細胞の大きさは約 $10\mu\text{m}$ であり、この細胞の大きさよりも小さい微粒子に対しては、細胞が反応していることを示している。このことから微粒子の生体親和性はサイズに依存することが示唆された。そこで本研究ではこういった細胞機能を用いて、ナノ・マイクロ微粒子に対する細胞の反応について研究した。

第一に構成物質による反応の差異を比較できた。ニッケルのイオン化による細胞障害作用に比べ、鉄はあまり細胞に影響を与えなかった。元々細胞の生存に影響を及ぼす物質はその化学的作用が重要である。しかし、イオン溶出する金属もサイズ依存性を示し、サイズが小さくなるほど細胞反応は強くなり、細胞生存率は有意に低下した。これはイオン溶出量の実験からもわかるように表面積の大きさが影響していると考えられる。微粒子になると微量でもかなり大きな表面積を持つためイオン溶出量も格段に増加する。

第二に生細胞に反応を惹起させる臨界寸法を測定することを目的とし生化学的アッセイを行った。結果として

50nm の二酸化チタン微粒子に対しても細胞は反応し、サイトカイン等の放出を検出した。細胞が無反応となる粒子は 50nm 以下であることが示唆された。しかし、この反応は 3mm^2 500nm の粒子に比べ有意に低く、細胞が処理しない、もしくは出来ない大きさである可能性がある。ナノ粒子は健康評価において影響があると判定されており、肺胞マクロファージにおける活性酸素の誘導以外にも量一効果関係が確認できた。その結果では *in vitro* ではナノ粒子はサブマイクロに比べ細胞への直接的影響は小さかった。^{1,2,3} さらに純粹にこの大きさで分散出来る方法で *in vitro/in vivo* で実験する必要がある。

第三に粒形による炎症反応の違いを二酸化チタンの塊状粒子と針状粒子を用いて調べた。針状の粒子は同じサイズの球状粒子に比べると毒性が強く、炎症性サイトカインの放出は有意に高かった。また、針状の粒子もその大きさによるサイズ効果が認められた。ただ、材料の種類による違いもナノレベルの粒子では大きな要因となると考えられた。先のアスベストとのかねあいもありCNT、アスベスト各種と比較検討する必要がある。我々の実験では炭素ナノチューブでは血管拡張などの炎症は生じたが肉芽腫の発生は確認できていない。確かに形状的にはアスベストと似ており精査が必要であるがヤング率などの物理的特性が異なる。実際、我々の研究では塊状粒子よりも針状粒子の方が同一サイズでは細胞に障害を起こし、細胞のサイトカイン産生量に影響を与えたが、同一サイズのCNTにそこまでの傷害性は認めなかった

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。ナノ粒子の環境及び人間の健康への影響については検証がほとんど行なわれていない。我々の実験では 50nm 以上の粒子は呼吸によって侵入することはない。しかし生体内では摩耗によって生じることがある。ただこれらサイズの粒子はマクロのバイオマテリアルとほとんど同じ生体反応を生じ影響は小さい。サブマイクロの粒子状物質は、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る。その結果周囲に炎症を起こす。またこのレベルの摩耗分は生体内で長く影響を及ぼす。その結果、細胞に取り込まれた粒子が他に運ばれず貪食、集積、貪食のループを繰り返し、放出される活性酸素、サイトカインによる炎症が組織を傷害するためおそれがある。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唆された。マクロファージなどの異物除去反応が機能しない 50nm 未満の粒子は全身に循環してしまうことが考えられる。その結果が蓄積されるのか、排出されるのか、細胞内にはどのように侵入し影響を及ぼすのか検討が必要である。ナノ粒子は粒が小さいので、単位重量あたりの表面積が粒の大きな粒子より大きい。ナノ粒子の周囲に付着した大量の有機物が人体に悪影響を及ぼす可能性も考えられた。さらに、ラットの大食細胞（マクロファージ）、通常これが肺に入る異物を処理するが 50nm 以下のナノ粒子を処理できない可能性が明らかになった。これは 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導き出される。逆にこのサイズであれば粒子にステルス機能を持たせ、ドラッグデリバリーシステムな

ど生体応用が可能かもしれない。

以上の研究からナノ・マイクロ微粒子の生体為害作用には生体固有の大きさと粒子のサイズによって決定される材質非特異的な物理的なサイズ効果があることが明らかになった。(Fig.24) また、粒子の形状や物理的な特性も細胞為害性に影響する可能性が考えられる。今後ナノテクの安全性の確保や応用には、このサイズ効果を考慮する必要がある。

E. 結論

一般に材料の組織為害作用は細胞障害を引き起こすイオン溶出による化学的效果が大きい。しかし、マイクロ・ナノ微粒子になるとサイズや形状といった物理的特性による影響が大きくなることが明らかになった。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。

ナノ・マイクロ微粒子の *in vivo* および *in vitro* での組織反応を検索することを目的として、動物埋入実験および細胞実験を行い、以下の結論を得た。本年度は、粒子の改良、実験系の改善でより詳細なデータをとることが出来た。その結果、ナノ・マイクロ微粒子に対する *in vivo*・*in vitro* での反応のメカニズムに関する有益な知見が得られた。

1. 微粒子の生体親和性および為害性はサイズに影響されることが示唆された。また、その為害性は細胞の炎症反応が関与していることが示唆された。

2. 化学的に影響を及ぼさないバイオマテリアルの微粒子はマクロの材料とは異なり炎症反応を惹起する。長期的には炎症症状は沈静化するが、微粒子は残留する。さらに小さなナノ粒子になると生体の防御機能を免れ全身に拡散する可能性がある。
3. 微粒子に対する細胞の反応はサイズによって影響を受ける。その一番大きな要因としては細胞が取り込むことが可能な大きさかどうかとすることである。次に粒子自体の問題が考えられた。ナノ・サブミクロン粒子は凝集して二次粒子を作ったり、静電氣的な力によると考える細胞膜への集積を認めた。この結果貪食できる大きさになったり、細胞膜への刺激になったりすると考えられた。
4. 微粒子が異物反応を誘発した場合、マクロのバイオマテリアルとは異なり炎症反応を惹起し、周囲組織に損傷、創傷治癒の遅延をおこしうることが示唆された。
5. 微粒子を取り込んだマクロファージは局所でサイトカインを放出した。周囲細胞はそれにより炎症を発現する可能性が示唆された。また、動物実験から粒子を取り込んだ細胞により微粒子が凝集しさらに細胞に取り込まれ集積していく仮説が考えられた。
6. カーボンナノチューブ (CNT) およびカーボンナノファイバー (CNF) を皮下組織に埋入した場合、周囲組織に短期的な炎症症状が発現する。長期に持続する強い炎症反応は惹起せず、線維化により被包化され凝集した。
7. サブマイクロ粒子の多くはマクロファージや周囲細胞に取り込まれる。それらは異物として生体反応を惹起する。しかし、ナノ粒子に対する反応はサブミクロンレベルの粒子と比較すると弱

かった。この特性がステルスバイオマテリアルとしての利用として有効なのか、もしくは生体に未知の害を与えるのか、時間的、量的検討が必要である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iosif ROSCA, Fumio WATARI, Motohiro UO, Tsukasa AKASAKA, Kazuchika TAMURA, Mechanism of biodegradable polymer microparticle formation by emulsification solvent evaporation method, 傾斜機能材料論文集 FGM

2004, 87-92

2) Fumio WATARI, Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Takao KOHGO, Motohiro UO, Yoshinobu NODASAKA, Tadahumi DOMON, Yasunori TOTSUKA, Size Dependence of Cytotoxicity in Fine Particles of Titanium, Nickel and Other, Archives of BioCeramics Reseach 4(1) 78-84

2 学会発表

1) ○田村 一央、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亘理文夫, Cytokines emission of macrophages by carbon nano particle, 第25回フラーレンナノチューブシンポジウム, 平成16年1月,

2) ○Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Motohiro Uo, Fumio WATARI, Yasunori TOTSUKA, Size-Dependent Effects of micro/nano Dental Particles, The 82st general Session of the International Association for Dental

Research, Honolulu Mar. 2004

3) ○田村 一央、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亘理文夫、ナノ・マイクロ微粒子の生体への影響 -歯科診療で発生する微粒子の細胞への影響-, 第43回日本歯科理工学会, 平成16年4月, 歯科材料・器械 24(2)115(2004)

4) ○ Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Motohiro Uo, Fumio WATARI, Yasunori TOTSUKA, Biologic effects induced by micro/nano particles in vivo and in vitro study, The 7th International Biomaterial, Sydney May. 2004

5) ○田村 一央、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亘理文夫、ナノ・マイクロ微粒子に対する in vitro および in vivo での細胞・組織反応, 第26回フラーレンナノチューブシンポジウム, 平成16年7月,

6) ○田村 一央、戸塚靖則、亘理文夫, Biologic effects induced by micro/nano particles in vivo and in vitro study, 第46回歯科基礎医学会, 平成15年9月, 歯科基礎医学会雑誌 46(4)77(2004)

7) ○田村一央, 生体反応に及ぼす微粒子のナノトキシコロジー効果. 平成16年度北海道歯学会, 平成16年11月

8) ○田村 一央、熊沢龍一郎、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亘理文夫、ナノ・マイクロ微粒子バイオマテリアルの組織障害の機序, 第26回バイオマテリアル, 平成16年11月, 第26回バイオマテリアル学会・抄録集 26(4)202(2004)

Fig.1

Material 材料の調整

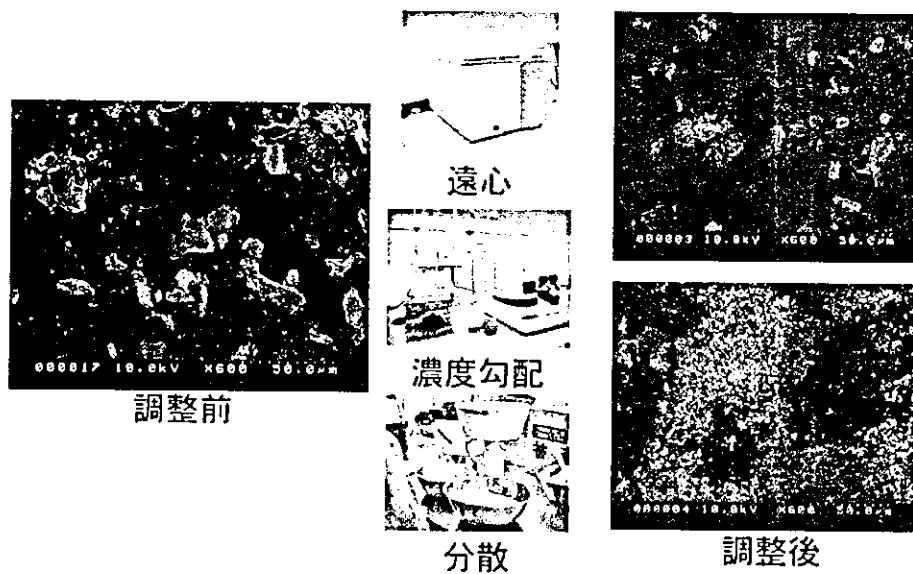


Fig.2

Materials Ti 微粒子

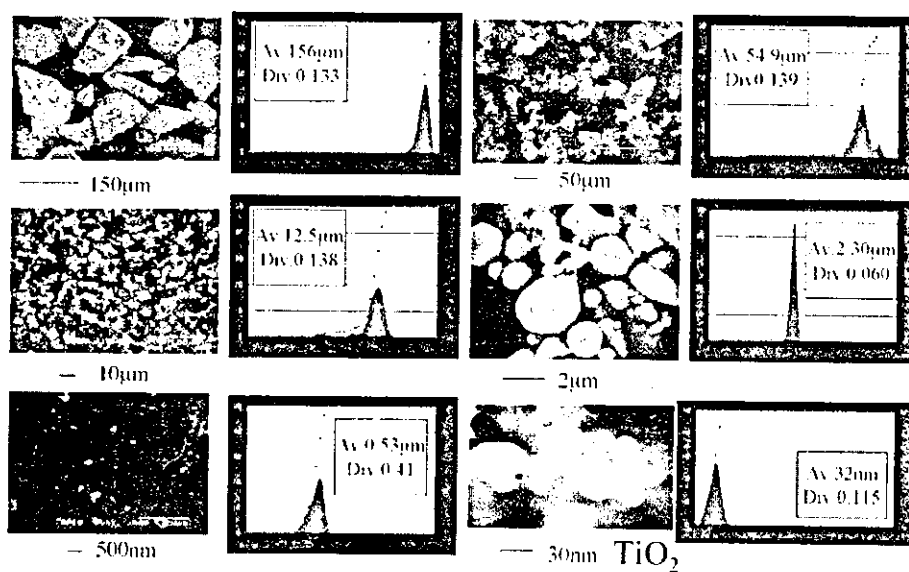


Fig.3

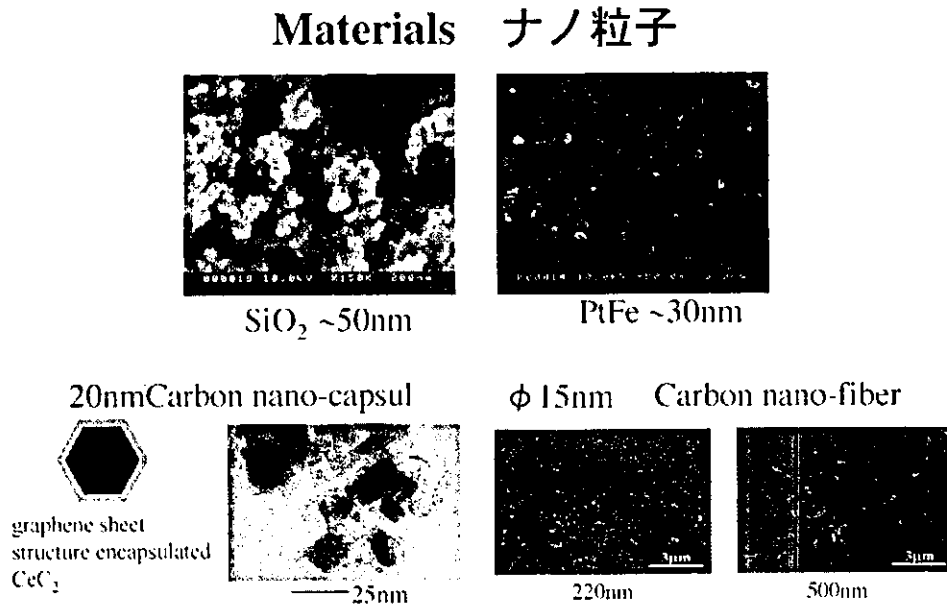


Fig.4

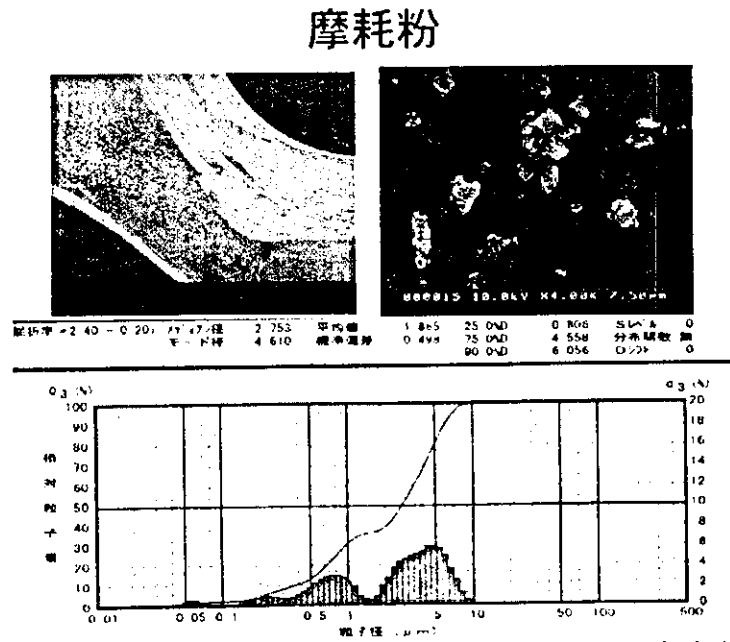


Fig.5

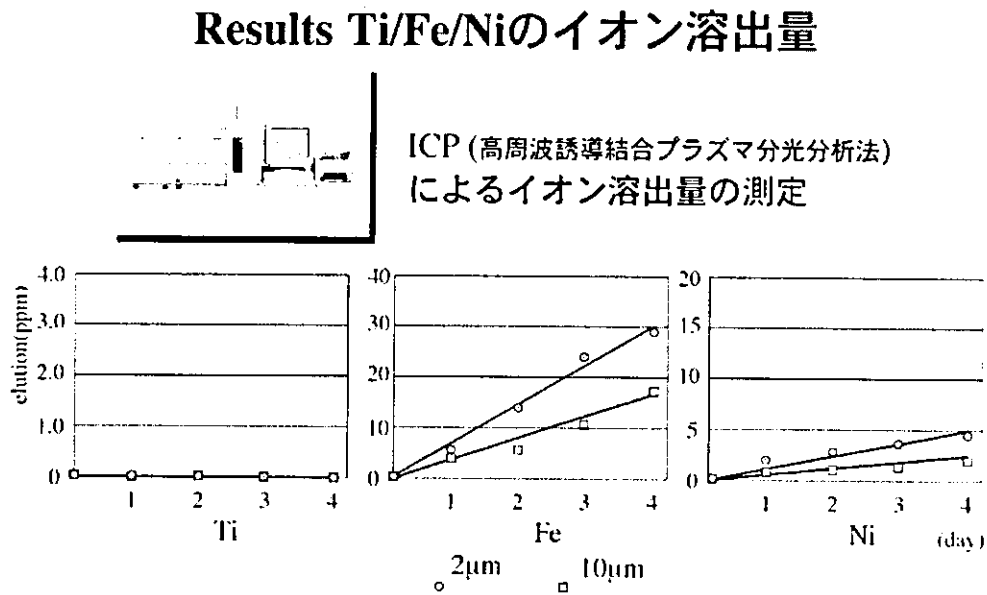


Fig.6

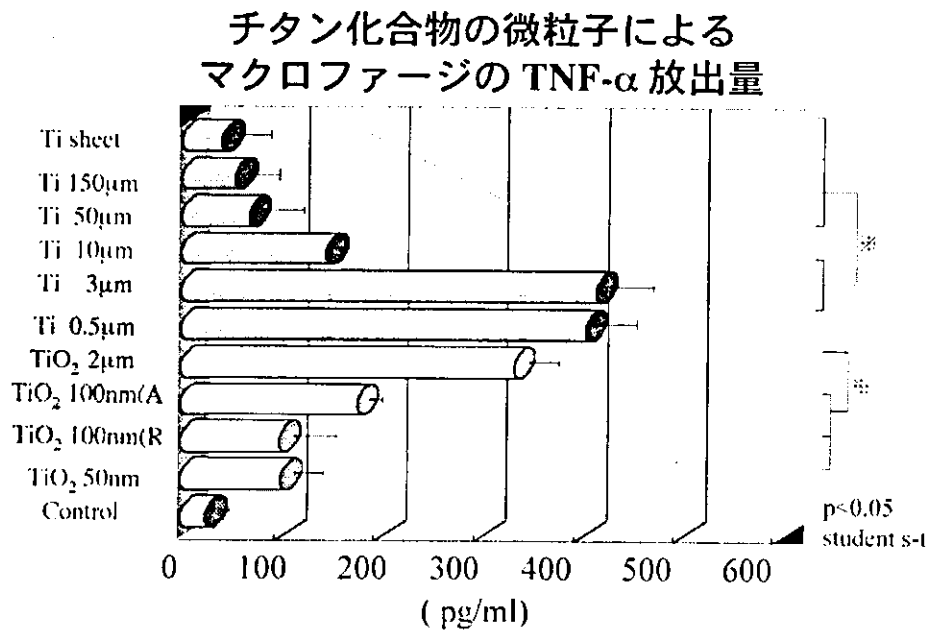


Fig.7

ナノ粒子に対する 肺胞マクロファージの反応

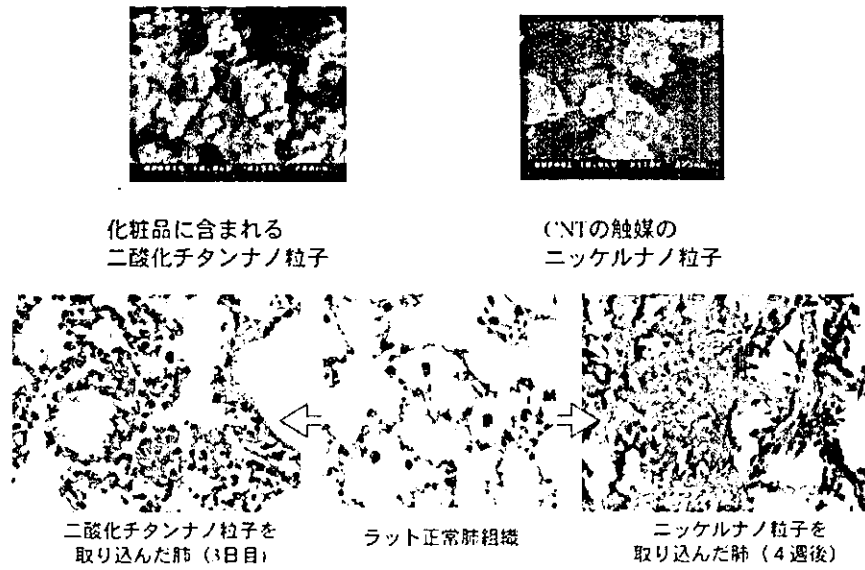


Fig.8

呼吸によって取り込まれたナノ粒子

