

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発 1
亙理 文夫 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
- (研究協力者報告)
- A. 生体に投与した各種金属微粒子の体内動態のイメージングに関する研究 25
阿部 薫明 (北海道大学大学院歯学研究科 助手)
- B. 生体内に包埋されたナノ微粒子の高分解能電子顕微鏡観察に関する研究 40
坂口 紀史 (北海道大学エネルギー変換マテリアル研究センター 助教授)
- C. 単細胞個体ゾウリムシをバイオアッセイ系としたカーボンナノチューブ 56
および磁性ナノ微粒子の細胞内動態と細胞毒性に関する研究
芳賀 信幸 (石巻専修大学理工学部 教授)
- D. レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用 69
フラーレン誘導体マーカートの調製
赤坂 司 (北海道大学大学院歯学研究科 助手)
- E. 生体と無機ナノ粒子のかかわりと応用に関する研究 74
米澤 徹 (東京大学大学院理学系研究科 助教授)
- F. 歯根象牙質表面へのBMP-2塗布による硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす 80
象牙質表面構造の影響
川浪 雅光 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
- G. 乳歯歯根吸収部位における修復機構の存在とナノ物質の影響について 88
八若 保孝 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
- H. 電界型X線の細胞照射効果 94
奥山 文雄 (名古屋工業大学工学研究科 名誉教授)
- I. ヒップシミュレータ試験により発生したポリエチレン摩耗粉の形態解析 99
水野 峰男 ((財)ファインセラミックスセンター材料技術研究所 主席研究員)
- J. 人工股関節用カップ材に適用可能な 104
カーボンナノチューブ-アルミナ複合材料に関する研究
大森 守 (東北大学工学研究科附属エネルギー安全科学国際研究センター 技術補佐員)
- K. 人工関節及びデンタルインプラント用チタン材料への 111
表面炭化による耐摩耗性付与
朱 禹赫 (北海道大学大学院歯学研究科 大学院生)
- L. BNナノチューブ/チタン複合材料の作製と特性評価 115
宇尾 基弘 (北海道大学大学院歯学研究科 助教授)

II. 分担研究報告

1. イメージング質量分析を用いた生体組織評価(1) 119
田路 和幸 (東北大学大学院環境科学研究科 教授)
2. カーボンナノ物質に対する生体反応—生体材料への応用と生体内分布— … 131
横山 敦朗 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
3. ナノ微粒子のin vitro, in vivo生体適合性評価に関する研究 152
遠山 晴一 (北海道大学病院 助教授)
4. ナノコンポジットの体内挙動検索に関する研究 160
—合成炭酸アパタイトコンポジットのナノ物理化学的性状—
岡崎 正之 (広島大学医歯薬学総合研究科 教授)
5. カーボンナノチューブによる揮発性有機化合物(VOCs)の吸着除去に関する研究 … 168
古月 文志 (北海道大学大学院地球環境科学研究院 教授)
6. BNナノチューブおよびアスベスト類の細胞毒性評価と 172
BNナノチューブの口腔内細菌吸着への応用に関する研究
森田 学 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
7. (1) コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした 178
細胞培養担体の開発に関する研究
(2) ミクロンからナノ・オーダーへの「人工細胞外マトリックス幾何学」の提唱: … 186
ハニカム状長軸構造を持つ β -TCPの血管・骨の新生誘導能に関する研究
北川 善政 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
8. 生体内物質動的化学マッピング技術の開発 191
朝倉 清高 (北海道大学触媒化学研究センター 教授)
9. 生体観察を目指したTEMエンバイロメンタルセルの開発 201
大貫 惣明 (北海道大学大学院工学研究科 教授)
10. アパタイト修飾マイクロチタン粒子に関する研究 209
浅岡 憲三 (徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 教授)
11. ナノアパタイトの全身動態検索に関する研究 224
石川 邦夫 (九州大学大学院歯学研究院 教授)
12. 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 232
バイオ応用に関する研究
戸塚 靖則 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

総括研究報告書

ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発

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

ナノパーティクルは人体が想定してこなかった新たな異物であり、生体防御機構が十分対応できず、呼吸・消化器系を通して体内に直接侵入し全身に拡散する可能性がある。生体為害性材料にあっては発ガン等の為害性昂進、生体活性・不活性材料では長期大量被曝によるアスベストのような慢性的な疾患形成等も可能性として考えられる。

一方 DDS をはじめとするナノテクノロジーのバイオ医用応用は 21 世紀高齢社会における個人の健康・QOL 実現、若年者層に負担の大きい社会保険と福祉に投ずる国家財政負担の軽減の点から必須の課題である。

ナノトキシコロジー予防とナノテクの人体へのバイオ応用実現のためには、あらかじめ微粒子の体内動態を把握・コントロールする必要があり、そのためにはまず体内動態の可視化方法の開発が前提となる。ここでは、(1)全身・臓器、(2)組織、(3)細胞の各レベルで可視化を実施し、時間・材質・サイズ依存性解析を行った。

ラット強制曝露試験、軟組織内埋入、マウス尾静脈血管内注入を、Ti, Fe, Ni, Pt, TiO₂, Fe₂O₃, TiC, CNT, CNF 微粒子などについて行い、(1)広領域(100mm 程度)全身・臓器レベル分布像には、①X線走査型分析顕微鏡(XSAM)元素マッピングの適用と、②レーザー/マス・マッピング法(イメージング質量分析: MALDI-TOF-MS)を開発し、(2)組織・(3)細胞レベルには光顕・電顕、細胞内 CNT 結晶には超高压電顕高分解能観察を行った。

30nmTiO₂ の呼吸器系への強制曝露試験により病理組織像から肺胞から血中への移行と、さらに XSAM により全身に拡散することが認められた。

尾静脈直接投与後の摘出臓器間比較、開腹全身イメージングから、TiO₂ は投与直後肺に到達し十数時間かけて濃度が減衰するとともに、肝臓へは数時間、脾臓へは数十時間かけ次第に到達した。挙動は材質にも依存し、Fe や Pt では脾臓への蓄積が特徴的に観測された。SEM-EDS 元素マッピングにより肺や脾臓の臓器内部での微粒子の偏在が観察された。

構成元素がCからなり元素マッピングでは生体内で識別困難な糖鎖・蛋白質、および純炭素のフラーレン・CNTの分布像出を可能にするために、水溶性フラーレンをマーカーとするレーザーアブレーション/マススペクトルマッピング法を開発し、ラット肝臓からの解離フラーレンイオンの検出と2次元分布像の描出を実現した。

in vivo 埋入試験では金属Ti微粒子は貪食された後、細胞死を導き局部組織に残留するが、TiO₂やCNTでは細胞死を導かず、その結果、細胞とともに遊走する可能性がある。長期組織埋入後、イオン溶出が無視できるほど低く物理的サイズ効果が支配的なTi微粒子では、100～10μmサイズの場合、粒子群中に炎症性細胞浸潤と線維性結合組織がともに形成されたが、10μm以下では貪食→細胞死→局所残留を繰返し次第に凝集化が進行した。イオン溶出性のFe, Niでは埋入期間とともに、炎症、壊死、腫瘍形成に進展し為害性が顕著に亢進した。CNTやCNFでは細胞内取込とライソゾーム内でのある種の生分解挙動が観察され、超高压電顕を用い生体組織中での高分解能観察を可能にした。単細胞個体(ゾウリムシ)をバイオアッセイ系としCNTと磁性ナノ粒子の細胞内動態・毒性評価を行った。

微細粉の典型的な臨床問題例である人工関節摩耗粉については、摩耗シミュレーション試験による摩耗量と摩耗粉解析、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)ワクチンによる骨溶解抑制、耐摩耗性と潤滑性を兼ね備えたCNT-Al₂O₃コンポジットカップ材、および表面炭化Ti耐摩耗性インプラント材料の開発を行った。

CNTとアスベスト他の繊維状・針状微粒子の性状比較・細胞毒性評価、バイオ用ナノ粒子・コンポジットの作製・機能性付与、CNTの揮発性有機化合物の選択吸着による環境浄化応用、組織再生用スカフォールドへの応用、CNT電界放出型ミニチュアX線源、光電子顕微鏡、生体観察用TEM雰囲気セルの開発を行った。

以上、各種微粒子の体内動態イメージングを全身レベル、組織・細胞レベルで開発実施し、経時変化、材料依存性の情報取得を可能にした。Fe, Niの為害性昂進に現れた化学的溶出性に基づく比表面積効果は材料自体に由来する効果であるが、Ti, TiO₂, CNTに見られる物理的サイズ効果による刺激性は微粒子が誘発する生体反応に起因する生物学的プロセスによるものであり、微粒子の体内分布・動態、炎症や免疫システムのナノトキシコロジーの原因になるとともに、周囲環境条件に応じて組織再生・成熟化にも働く生体の最も基本的な現象である。微粒子の体内動態の解明はDDSの薬剤移送経路と同一にし、ナノトキシコロジー/バイオ応用のメリット/デメリットの両面における生体影響を検討する上で必須の知見である。

分担研究者

田路 和幸	東北大学大学院工学研究科	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	北海道大学大学院歯学研究科	教授
戸塚 靖則	北海道大学大学院歯学研究科	教授
北川 善政	北海道大学大学院歯学研究科	教授
森田 学	北海道大学大学院歯学研究科	教授
朝倉 清高	北海道大学触媒化学 研究センター	教授
古月 文志	北海道大学大学院 地球環境科学研究所	教授
大貫 惣明	北海道大学大学院工学研究科	教授
遠山 晴一	北海道大学病院	准教授
石川 邦夫	九州大学大学院歯学研究院	教授
岡崎 正之	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科	教授
浅岡 憲三	徳島大学大学院ヘルスバイオ サイエンス研究部	教授

A. 研究目的

1. 材料のナノサイジングと生体反応性

1900年マックス・プランクが発見して以来、量子力学はサイズが小さくなると巨視的なニュートン力学とは挙動の異なる電子や光子の世界があることを明らかにした(図1)。こうした材料のナノサイジングに対して生体はどのように反応するのであろうか。

本研究者は2000年以来世界に先駆け研究を進め、2004年のナノトキシコロジーという用語の出現、2006年のアスベスト問題の再燃以前から、生化学的手法を応用した評価法により材料の

ミクロ/ナノサイジングによる生体反応性を調べ、①細胞と同程度(約10 μ m)になると刺激性が著しく昂進し生体親和性材料でも炎症を誘発する、②本来為害性のNiは微粒子になると腫瘍を誘起する、③30nm大のナノ粒子は人体が生体防御機構の対象と想定してこなかったサイズであり、呼吸によって肺胞に到達して血中に取り込まれ全身に拡散することを見出した。

2. 比表面積効果

材料のナノ/マイクロサイジングの効果は、比表面積効果で論じられるのが通例である。比表面積はサイズに反比例して増大するから、化学反応もまた著しく増大する。上記②のマクロでアレルギー性を示すNiがミクロ/ナノ微粒子になると著しく為害性が昂進し、1年後には腫瘍を生成するに至る現象はイオン溶出に起因する効果であり、その典型例である。これは材料自体の特性変化に起因する効果である。

3. 比表面積効果で説明不可能な微粒子効果

しかしナノサイジングの効果はそれだけに留まらない。生体組織との相対的な関係で発生する効果もサイズに依存する微粒子特有の効果として現れる。

イオン溶出が無視できるほど耐食性が高く生体親和性にすぐれたTiはインプラントに使われるが、人工関節の骨頭摺動部に使用された場合には摩耗粉を発生し周囲組織に炎症を引き起こす。またアスベストは材質的には粘土鉱物の一種で本来毒性はないが、長期大量に被曝すると約30年経て中皮腫を発症するに至る。こうした現象には同種の特性が昂進する比表面積効果では説明困難なある種の機能性転換が見られる。材質が毒性か生体親和性かという特性とは別に、微粒子というサイズ、形状に起因する効果が寄与していると考えられる。上記①の材料によらず10 μ m以下で食食を誘発し刺激性が昂進する物理的サイズ効果はこれにあたる。

4. ナノ微粒子の体内侵入・拡散

50nm以下では微粒子刺激性がむしろ低下し生体防御機能が十分に作用せず、上記③のように呼吸器系・消化器系を通して体内侵入を許すことになる。微粒子材質により細胞死を導きその場に蓄積する、血流によって腎臓、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ものがある。

5. 体内動態可視化方法

これらナノ微粒子の挙動は細胞から組織、全身、

個々の臓器レベルと単純ではなく、またきわめて微細で体内で拡散して密度も低いことから検出は容易ではない。本研究は体内分布解析をそのスケールにより以下の4段階に分け、細胞、局所組織レベルの後、最終的な安全性確認の上で必須の全身動態を可視化する手法を開発することを目的とした。

(1)広領域(100mm程度)全身分布像

①XSAM元素マッピング像

(分解能100～10 μ m)

②レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング法(レーザーマス法)

(分解能50～100 μ m)

③既存の全身造影法(X線CT、MRI、PET)の有効性検討

(2)中領域(100 μ m～10mm程度)ー光学顕微鏡、顕微ラマン(分解能1 μ m)

(3)微小領域(10～100 μ m程度)ー走査型電顕SEM-EDS法またはEPMA法(分解能1 μ m)

(4)超微小領域(1nm～10 μ m程度)ー透過型電顕、微小領域分析(TEM-EDS)や高分解能電顕観察(分解能1nm)

6. 全身動態イメージングの主要2方法の開発

体内動態イメージングの最初に位置付けられ、最も主要な核をなすのが下記の全身動態を可視化する2方法の開発である。

①XSAM元素マッピング法

X線走査型分析顕微鏡(XSAM：図2)を用いて収束X線プローブを照射し、試料から発光した蛍光X線をマッピングし100ppmレベルの高感度元素分布像を得る(分解能100 μ m～10 μ m)。

検出元素はNa以上の元素であり、電子線によるSEM-EDS(エネルギー分散型X線元素分析)やEPMA(電子線プローブマイクロアナライザー)法に比べ、分解能は低く強度が低く時間は要するが、高感度であり100ppmレベルの検出がラットのような広領域で大気中分析が可能である。

②レーザー/マス法(イメージング質量分析：MALDI-TOF-MS)

水溶性フラーレン(C60)を結合させた試料中ターゲット物質にレーザービームを照射すると蒸散後、容易にフラーレン単体に乖離し(図3)、きわめて鋭いマススペクトルピークとして高感度に検出され、2次元分布像が得られる(図4：分解能は約50～100 μ m)。

XSAM元素マッピング像では不可能なNa以下の軽元素を含む化合物、とりわけCNTや窒化ホウ素(BN)、PCB等、生体組織と同じC、N、Oの元素からなり元素マッピングでは区別が付かない物質には有効性が高い。

7. 目的

本研究は1)バイオ用ナノ微粒子、ナノチューブの作製・表面処理・機能性付与・物性解析、2)in vitro, in vivo 生体適合性評価、全身動態試験、3)ナノ微粒子の体内分布可視化方法の開発(全身分布イメージング、微視的観察)、4)体内動態の可視化を通して、その機序の解明、ナノトキシコロジー/安全性条件の検討、ナノ構造体のバイオ応用開発を図ることを目的とした。

材料の微細化に伴う生体反応挙動はナノテクノロジーのバイオ応用、とりわけ人体への本格的な適用にはその把握と機構解明が必須であり、医学的にも材料学的にも大きな発展性を秘めたテーマである。本研究の推進は国民の安心できるナノテクノロジー開発の確立、全身健康・予防増進、高齢者の自立・QOLの実現、若年者層に負担の大きい扶養・介護、保険・福祉財政の低減に寄与するものである。

B. 研究方法

各研究内容に関する実験方法は後出の各分担研究者、研究協力者の報告書に記載してあるので、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、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. バイオ用ナノ微粒子・コンポジットの作製・機能性

付与・特性解析

(1) バイオ用ナノ微粒子の作製(米澤)

湿式法により、①生体親和性の高い高分子を保護剤とするナノ粒子、②比較的大きな金属ナノ粒子の大量調製、および③保護剤なしに安定に水中に分散させた金属ナノ粒子の調製を行った。

①生体関連高分子表面吸着保護ナノ粒子

高分子としてゼラチンを、還元剤として NaBH_4 を用い、保護・分散剤として生体関連高分子ゼラチンで被覆したナノ粒子の作製例として、平均粒子径 2.8 nm の均一分布の球状酸化鉄(マグネタイト)粒子を合成した。SQUID 測定から超常磁性で希土類磁石に付着し、磁性ナノ粒子としてバイオセンシングへの応用展開を図る予定である。

②生体親和性有機酸を保護剤として水中分散させた金属ナノ粒子

還元剤、保護分散ともにクエン酸が担う方法で、Au や Ag ナノ粒子では粒子径が大きくなると、平板状やロッド状の異形状が増加する。限外ろ過膜でクエン酸を除去し、異方性粒子の除去には円状ポアを有する 0.4 μm のフィルターでろ過し、球状 Ag ナノ粒子を得た。これを 1 匹/L の水槽中に 10 mg/L の濃度で添加し、2 日ごとにコロイド分散液を交換し金魚に 6 日間飼育暴露すると、腸壁への Ag ナノ粒子の付着が観察された。

ポリペプチドはそれ自体のままのほか、金属配位部位を持たせ単分子膜様に保護することも可能である。ポリペプチドの末端に硫黄部位を持たせ、D,L-リポ酸を末端基として合成した PBLG (ポリベンジルグルタメート) (Lipo-PBLG) を使用して Au ナノ粒子を合成すると、ナノ粒子上に Lipo-PBLG 単分子膜が形成され優れた保護能を示す。

③保護剤なしで水中分散可能なナノ粒子の作製：レーザーアブレーション法

保護剤を添加せず、金属の表面を裸のまま分散させるナノ粒子生成法として、インゴット(板)へのレーザーアブレーション法を適用し、Au、Pt ナノ粒子を作製し、安定な分散状態を示したが、Pt は数日で沈殿化し、Au ナノ粒子は非常に安定に保持継続した。

(2) アパタイト修飾マイクロチタン粒子の作製(浅岡)

従来の生体内移植器具はマクロな歯や骨の器官レベルを対象としたものであり、今後の低侵襲医療、予防医学の実現には生体組織や細胞をターゲットにしたマイクロ・ナノレベルの機能性バイオ

マテリアルの開発が欠かせない。化学的な溶液浸漬法によりチタン表面にアパタイトを析出させ骨と融和促進する方法は既に開発してきた。この方法をチタン微粒子に適用すれば、組織や細胞をターゲットとしたマイクロ材料として、極めて速い骨との反応が期待できる。アパタイト被覆マイクロチタン粒子の作製とチタン微粒子焼結体を作製することを試みた。アパタイトをコーティングするチタン微粒子としてチタン多孔体を用いれば、比表面積が大きくなり、チタンの表面機能がより有効に発揮できる。化学的な前処理と擬似体液浸漬法により、アパタイト被覆マイクロチタン多孔質粒子を作製した。タンパクや薬剤を含浸する方法で生体機能を付与した移植材料、あるいは薬物や成長・抑制因子を徐放できる基礎素材として期待できる。

(3) BN ナノチューブ/チタン複合材料の作製と特性評価(宇尾)

CNT とは別種のナノチューブとして近年開発された窒化ホウ素ナノチューブ(BNNT)と Ti からなるナノ繊維強化複合金属の開発を行った。凝集性がきわめて高い BNNT と Ti の混合粉末を界面活性剤により目視レベルで均一分散し、放電プラズマ焼結により緻密焼結が可能となった。焼結後も BNNT の微細構造は保たれているが、顕微鏡からなお BNNT の凝集が観察され、分散性の更なる改良により強度向上が期待される。

II. ナノ微粒子の体内動態と可視化方法の開発

ナノ微粒子の体内動態を全身、臓器、組織・細胞レベルでマッピング表示、顕微鏡観察・分析を行った。

II.1 全身動態/臓器間比較

(4)XSAM 元素マッピングにより可視化した各種ナノ/マイクロ微粒子の全身動態イメージング

(4-1)呼吸器系からの強制曝露試験(戸塚)

図5は化粧品に使われている 30nm の TiO_2 粒子のラットへの強制曝露試験後の X線走査型分析顕微鏡(XSAM)による体内全身の Ti 元素マッピング像である。30nm ナノ微粒子は人体が生体防御機構の対象と想定してこなかったサイズであり、呼気によって肺胞に到達し、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移行が認められ、さらに XSAM マッピングから全身に拡散していることがわかる。

(4-2)尾静脈注入による各種微粒子の全身動態比較(阿部)

尾静脈注射による血流への直接投与の最適条件を定め、投与後の微粒子のマウス体内での循環の経時的な変化を可視化した。金属微粒子の分散剤として糖鎖誘導体である 1wt % オクチルグルコピラノシド、0.5wt % Tween20 を用いた。オクチルグルコピラノシドでは投与部の変色(黒色)、一部個体で尾部の壊死が観察されたが、Tween 溶液では投与部への影響は観察されなかった。

①体内循環の材料依存性－摘出臓器間比較

マウスの尾静脈から投与後、1日経過時の肺・肝臓・脾臓・腎臓の XSAM マッピングを行い、摘出臓器間比較を行った。

図 6 は金属微粒子(Ti, Fe)を投与 1 日後の各元素マッピングで、明るさが濃度の高低に対応している。Ti では肺と僅かに肝臓・脾臓に、Fe では肺・肝臓・脾臓、とりわけ非常に強く脾臓に信号が見られた。また Ni では肺・脾臓と僅かに肝臓へ、Pt では僅かに肝臓と特異的に強く脾臓への到達が観測された。酸化物の場合、TiO₂ では肺・肝臓と僅かに脾臓へ、Fe₂O₃ では強い肺・肝臓・脾臓への到達が確認された。いずれの場合も腎臓への到達は明瞭には確認されなかった。

②体内拡散の経時的変化－摘出臓器間比較

TiO₂ 投与後 3 時間で肺と相対濃度でその 1/10 程度で肝臓へ、1日経過後、肺での滞留濃度は急速に減少し、肝臓での変化は小さく濃度差は 1/4 程度になり、脾臓への到達も確認された。

1 週後では肺からは殆ど消失し、肝臓では変わらず脾臓ではなお信号が増加した。4 週後では肝臓で大きく脾臓で僅かに減少に転じた。これらを総合すると、TiO₂ は投与直後、肺に到達し十数時間かけて濃度が減衰するとともに、肝臓へは数時間、脾臓へは数十時間かけて次第に到達する。

③全身動態の可視化

TiO₂ 投与後、マウスを開腹し全身の体内動態の可視化を行った。図 7 に X 線透過像と Ti マッピング像を示す。投与後数分では肺のみから、3 時間経過後では肺に加え肝臓から、1 日後肺からの信号が弱くなり、4 週経過時ではほぼ肝臓のみから信号が観測された。ほかに Ti, Fe, TiC, Fe₂O₃ についても同様に体内動態イメージングを行った。図 8 に Fe と Fe₂O₃ についての結果(Fe 元素マッピング像)を示した。

④ SEM-EDS による臓器内分布表示－臓器

レベル

金属微粒子が到達した各臓器内における分布をエネルギー分散型 X 線元素分析(SEM-EDS)を用

いマッピング表示した。肝臓では臓器全体に一樣に分布するのに対し、Ti を投与した肺では組織構造に偏在して分布し、脾臓では投与 Ti, Fe 微粒子に対応する数 μm 大のスポットが局所的に観測された。

(5)レーザーアブレーション/マスペクトル・マッピング用フラーレン誘導体マーカーの調製(赤坂)

炭素系ナノ微粒子の体内動態の可視化するためのレーザーマスペクトル法のマーカーとして、細胞のレセプターや抗原に特異的に結合する糖鎖リガンドを共有結合させたフラーレン誘導体を分子設計した(図 3)。ガラクトースまたはグルコースが 1～2 個結合した水溶性フラーレン誘導体の合成が可能となった。

(6)イメージング質量分析(レーザーマス法)による体内分布イメージング(田路、佐藤、赤坂、横山)

上記(5)で調整したフラーレン誘導体を体内導入し体内動態可視化を試み、フラーレンの生体内での代謝分布評価法としての予備実験を行った。

XSAM、SEM-EDX、EPMA などの元素分析装置では、糖鎖、蛋白質、あるいは純炭素のフラーレン(C₆₀)、CNT 等を同様に有機化合物である生体内で検出識別することは不可能であり、別の原理に基づく検出方法が必要である。

“イメージング質量分析”のうちイオン化法としてレーザー照射により試料そのものの蛋白質を脱離・イオン化を行う従来の LD

(Laser-Desorption:レーザー脱離)では生体高分子が必ずしもうまく脱離やイオン化が進まず、検出感度や操作性の点で問題がある。これに対し、マトリックスを混合させた試料に高密度なレーザー光(多くは窒素レーザー 337 nm)を照射する MALDI では、マトリックスが容易に励起状態に達し温度上昇し、試料もろとも脱離(昇華)する。さらに蒸発した試料は高い励起状態にあるマトリックス分子からプロトンが移動しイオン化状態になる。

図 4 に示したように、この MALDI と分析法として TOF マスペクトロスコピーを組み合わせた MALDI-TOF-MS

(Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry:マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析)をナノパーティクルの体内動態可視化に応用すれば、ガンなどの注目する疾患に特有なバイオマーカー(正常・疾患を区別する指標になる物質)を検出し、2次元マッピングすることにより、生体

組織内での疾患の部位を視覚的にとらえ、臨床プロテオーム解析で重要なバイオマーカーの分布やナノ材料の代謝経路、DDS 薬剤の体内動態と到達部位などの可視化が可能になる。

本研究では上記(5)で調整した、マーカーに特異的に結合するように設計した水溶化フラーレンを体内導入し、検出には解離フラーレンイオン C_{60} (720 m/z) を測定することにより(図3)、生体内での結合蓄積部位の高感度視認と体内動態可視化を実現することを目的とした。

本年度はフラーレンそのものの体内動態可視化を試み、生体内での代謝分布評価法としての予備実験を行った。Nitrocellulose Membrane およびラット肝臓の組織切片に、水溶性フラーレン ($C_{60}(OH)_n$)、糖鎖化付加型水溶化フラーレン (グルコース二量体 $Glc_2-C_{60}(OH)_n$ 、ガラクトース二量体 $Gla_2-C_{60}(OH)_n$) を注入し(図3)、解離フラーレンイオンの検出とその2次元分布像の描出に成功した(図9)。選択的標識を有する水溶性フラーレン誘導体系は感度と選択性に優れた間接的モニタリングシステムである。

II.2 組織・細胞レベル動態

(7)組織内に長期埋入された微粒子の体内動態

(7-1)金属微粒子(戸塚)

各種金属微粒子のラット皮下軟組織への半年～1年にわたる長期埋入試験では、Ti の場合、微粒子サイズがおよそ $100\mu\text{m}$ 以上では線維性結合組織によって微粒子が個々に被包化され、炎症を呈することなくインプラントのようなマイクロサイズと同様、生体親和性を示した。10～ $100\mu\text{m}$ 粒子では粒子群中に線維性結合組織と炎症性細胞浸潤がともに生成し、長期慢性的な症状を継続した。 $3\mu\text{m}$ ～ 500nm 微粒子では炎症細胞による貪食、細胞内濃縮を繰返し、次第に凝集し、やがて線維性結合組織で周囲を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(図10)。粒子群の凝集化は $10\mu\text{m}$ 以下の微粒子で生起し、生物学的プロセスが関与しており、この時 *in vitro* の実験からは Ti のイオン溶出は無視できるレベルである。

溶解性の高い Fe ではイオン溶出して6ヵ月後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(図11)。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 はイオン溶出しやすいにもかかわらず、短期的には生体親和性を示して比較的影響は小さいが、長期にわたる組織への残留は持

続的に大量のイオン溶出を継続するため、重篤な傷害をもたらす可能性も考えられる。

図11に $0.5\mu\text{m}$ Ni 粒子をラット皮下に埋入後の経時的変化を示した。埋入直後から強い反応を惹起し炎症性細胞浸潤を引き起こした。イオン溶出が継続するため、1ヵ月後には周囲組織は壊死し、壊死層の周囲に強い細胞浸潤層、さらに炎症層が形成された。1年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。

(7-2)CNT(横山、佐藤)

CNT のラット皮下組織への長期埋入試験から、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惹起せず、その炎症の程度は $\text{CNT} > \text{CNF}(1200\text{nm}) > \text{CNF}(600\text{nm})$ 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(図12)、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。

(8)CNT の細胞内動態の電顕観察および超高压電顕高分解能観察(坂口、市野瀬、横山、野田坂、赤坂)

通常、生物試料は電顕下でコントラストがきわめて低く、重元素による染色とともに、低加速電圧、極小対物絞りの使用によりコントラストを像出している。これらの条件は大口径の対物絞りをを用いる高分解能観察とは相矛盾する条件である。ここでは生体内での高分解能観察を実現するために、ラット皮下に CNT を包埋し、一定期間経過後に取り出した生体組織片を観察対象とし、生体内における CNT の原子構造解析に向けた高分解能電子顕微鏡観察技法の最適化について検討した。はじめに、低加速透過型電子顕微鏡を用いることにより、生体組織と CNT 分散状況を同時に観察可能であることが分かった。さらに、超高压超高分解能電子顕微鏡を用いた高分解能 TEM 観察を併用すれば、生体内に存在する CNT の原子構造についても検討可能であることが本研究により

明示された。また、本手法を用いた CNT の原子構造解析により、生体内に包埋されたナノチューブ凝集体は、時間の経過と共に徐々に凝集が解体し、さらに結晶性の低下に伴い個々の CNT は分断され、最終的にはライソゾームに取り込まれていくことが明らかとなった。

図 1 3 に多層 CNT(MWCNT)の結晶構造模式図(a)と超高压電子顕微鏡(HVEM)による長さ方向平行断面(b)および垂直断面(c)の高分解能原子像を示す。

図 1 4 は CNT の派生体の 1 種カーボンナノファイバー(CNF)の結晶構造(a)と、ラット軟組織に 1 年埋入後、細胞内ライソゾーム中に取込まれ、破折断片化が進行中の長さ 1200nm の CNF (b) の 100kV 電顕像である。CNF は長さ方向に分断されやすい結晶構造を有し、経時変化を観察すると、食後、埋入期間とともにライソゾーム内で破折断片化が進行し、ある種の生分解性(biodegradation)を示す。

図 1 5, 1 6 は埋入 1 年後、細胞内ライソゾーム中の 1200nm-CNF の結晶構造が乱れた破折片部分の超高压電顕による高分解能原子像である。図 1 6 は約 15 原子層の厚みのわずかに結晶性が保たれている微細ナノ結晶破片である。

II.3 単細胞個体の微粒子に対する動態

(9)単細胞個体(ゾウリムシ)をバイオアッセイ系とした CNT および磁性ナノ微粒子の細胞内動態と細胞毒性評価(芳賢)

ナノ微粒子の生体反応性の評価システムの確立は緊急課題の一つであるが、本研究では任意のナノ微粒子の細胞親和性・毒性を短期間で、迅速に評価する方法として、単細胞真核生物で多機能同時発現細胞であるゾウリムシの使用に着目し、CNT、カーボンナノファイバー、フェライト系磁性ナノ微粒子、チタン酸化物、Ag ナノ微粒子を検討した。細胞内取り込み能力に関しては、高率から、0 まで幅広い細胞応答が認められた。培養液中での細胞分裂と生理食塩水中での生存能力に関しては、総じて溶液中の分散量の制御が適切であれば為害性は認められないが、Ag 粒子では強い細胞毒性を示し、細胞の膜電位制御系の崩壊との関連が示唆された。子孫の生存率も調べたが細胞毒性の評価項目として適切ではないと判断された。

III. 人工関節摩耗粉とその対策

人工関節骨頭摺動部から発生する摩耗粉は周囲組織に炎症を引き起こすため、事実上、人工関節

の使用寿命を規定しており、生体親和性材料の微粒子が疾患を引き起こす臨床上的の具体的実例である。その機序の解明と対策は高齢社会の QOL (Quality of Life) 実現に急務の課題である。

III.1 人工関節摩耗シミュレーション試験

(10)人工関節摺動部のヒップシミュレータ摩耗試験とポリエチレン摩耗粉の形態解析(水野、橋本)

超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)およびクロスリンクした超高分子量ポリエチレンライナー(c-UHMWPE)の耐摩耗特性を、ヒップシミュレータを用いて評価した。1000 万回試験では、c-UHMWPE は摩耗粉の産生量が少なく耐摩耗性に優れ、摩耗粉形状は繊維状で 2 ~ 10 μm の粒径が多く、UHMWPE では顆粒状で 2 μm 以下がほとんどであった。生体毒性との関連の検討が重要である。

III.2 人工関節周囲における骨溶解の炎症抑制因子による制御

(11)マクロファージ遊走阻止因子(MIF)ワクチンによる人工関節周囲骨溶解の抑制(遠山、小野寺)

人工関節置換術後に磨耗微粒子によって誘発されるインプラント周囲の骨溶解の原因として、TNF-a や IL-1 などの骨吸収性サイトカインの上流で制御するマクロファージ遊走阻止因子

(MIF) が関与している可能性がある。MIF に対する自己抗体を産生させる MIF デオキシリボ核酸(Th 修飾 MIF-DNA) ワクチンを開発し、in vivo でエレクトロポレーション法によりマウスに投与することにより、細菌内毒素 LPS で惹起された血清中の TNF-a の上昇の抑制に成功した。Th 修飾 MIF-DNA は MIF が主座となる病態の解析に有用であり、磨耗微粒子によって生じる骨溶解モデルに応用可能と考えられる。

III.3 耐摩耗性インプラント材料の開発

(12)人工股関節カップ部用 CNT-アルミナ複合材料の開発(大森)

人工股関節カップ材には超高密度ポリエチレンが最もよく使われているが、耐摩耗性が低く、磨耗粉の生体への影響や磨滅による耐用年限が 15 年に限定される等の問題があり、またアルミナでは耐摩耗性は高いが金属との摩擦係数が大きい問題点があった。本研究では摩擦係数が小さく耐摩耗性の高いカップ材として、アルミナ-CNT 複合材料の合成を放電プラズマ焼結により試みた。原料粉として前駆体の水酸化アルミニウムを使用することにより、従来、アルミナ粉を使用したものでは不十分であった強度・靱性を実用可能なレ

ベルまで引き上げ、かつ摩擦係数がアルミナの1/3以下の複合材料の合成に成功した。工業製品としての生産も可能である。

(13)人工関節及びデンタルインプラント用耐摩耗性表面炭化チタンの開発(巨理)

チタンの欠点である耐摩耗性を改善するために、高周波誘導加熱浸炭処理法による表面炭化処理を行った。1400℃処理で緻密で平滑な炭化チタン層(TiC)が形成され、ビッカース硬さは約2000と純チタンの約15倍に増大し、マルテンス引っかかり試験及び超音波スケーラー磨耗試験(図17)から母材チタンとの強固な固着と耐摩耗性が確認された。デンタルインプラントの歯石除去に用いられる超音波スケーラーの一般的臨床使用条件(50gf)では試料表面に損傷を生じず、また人工関節への応用の可能性も示唆された。

IV. ナノ微粒子の安全性

IV.1 微粒子の安全性、細胞毒性評価

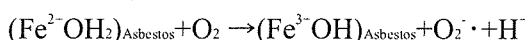
(14)CNTとアスベストの微粒子形態および性状比較(巨理)

ナノ微粒子の中でもその安全性が懸念されているCNTとアスベストとの類似性、差異についてSEM観察と物理・化学的性状比較を行った。

アスベストの材質自体は粘土鉱物のシリケートの1種であり、複合的な発ガン性の要因として第1に挙げられるのは針状結晶形態による物理的微粒子為害性効果である。代表的なアスベスト鉱物に、クリソタイル(白石綿)、クロシドライト(青石綿)、アモサイト(茶石綿)があるが、その形態はクリソタイルでは比較的湾曲しているのに対し、発癌性が高いクロシドライト、アモサイトでは顕著な針状形状を示す。

図18はアスベスト(クロシドライト)とCNTを混合し水中攪拌後、乾燥した状態のSEM像で、針状のクロシドライトに細いCNTがからまるように凝集している。CNTの直径がクロシドライトよりもさらに小さく、その形態はクロシドライトが顕著な直線状を示しほとんど湾曲することがないのに対し、屈曲性と凝集性に富んでいる。

アスベストの物理・化学的性状が親水性で分散しやすく、ダストとなって個々の針状粒子が容易に脱落し飛散するのに対し、CNTは疎水性で凝集しやすい。また分析すると発癌性が高いクロシドライト、アモサイトはFeを高濃度に含有し、フェントン反応：



に伴う活性酸素($\text{O}_2^{\cdot-}$)の発生の可能性があるのに対し、CNTでは蛋白質に対する吸着親和性を有している。

CNTはアスベストとはやや異なる形態・動態・挙動を示す。しかし数100nm以上の直径の大きいCNTや非カーボン性ナノチューブの一部では、屈曲性が乏しく微粒子形態の直線性が強くなり、アスベストに類似した形態も認められ、注意が必要である。

(15)BN ナノチューブおよびアスベストの細胞毒性評価と細菌吸着(森田、宇尾)

BN ナノチューブ(BNNT)及びアスベスト3種の細胞毒性試験ではいずれも粒子濃度の増加に伴い細胞活性が低下し細胞毒性が増加した。特に10ppm以上で見られた顕著な活性の低下は高濃度の微粒子の凝集・沈殿による細胞増殖の物理的阻害のためであり、また各微粒子間の細胞毒性には有意差は見られなかったが、刺激性が化学的組成に依存せず、物理的特性に由来するためと考えられた。

また口腔内細菌 *Streptococcus mutans* のBNNTへの高効率での吸着性が認められたが、BNNTの微細構造とタンパク質に対する強固な吸着特性のためと考えられ、細菌吸着剤としてのバイオ応用の可能性が示唆された。

(16)ナノチューブ、ナノ/マイクロ微粒子細胞機能性試験(戸塚)

顎口腔領域で使用されることの多いTiやFe, Ni微粒子とバイオ応用を目標としているCNTについて好中球を用い生体適合性の検討を行った。金属微粒子を採血したヒト末梢血から分離した好中球と混和し、細胞生存率、乳酸脱水素酵素活性値、活性酸素・サイトカイン産生量を測定した。その結果、すべてのサイズのNiと10 μm 未満の微粒子は細胞為害性が高く、10 μm 未満の微粒子に対して好中球は貪食を起こしていた。針状と球状では針状の方が細胞為害性が高かった。微粒子の細胞為害性には材質、サイズ、形状が関与する。

V. ナノ構造構築によるバイオ応用開発

V.1 組織再生

V.1.1 スカフォールド

(17)細胞増殖スカフォールドへのCNTの応用(横山)

CNTスカフォールド上に播種した骨芽細胞様細胞(Saos2)は培養増殖するとともに、通常、紡錘状に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、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(図19)。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(図20)であり、純炭素の同素体のうち、グラファイトがほとんど細胞付着性を示さないのに対し、CNT はすぐれた細胞付着・伸展性と蛋白質吸着能を示した。単層(SWCNT)と多層(MWCNT)を比較すると、SWCNT のほうがより高い細胞増殖、アルカリフォスファターゼ(ALP)酵素活性を示した。

(18)CNT 被覆コラーゲン新規細胞培養担体の開発(北川、久保木、宇尾)

CNT は細胞付着・伸展性に富み、コラーゲンに対する親和性も高い。他方、コラーゲンコートディッシュは高い細胞付着性を持ち、現在、細胞培養に頻用されている。本研究ではCNT 吸着コラーゲンコートディッシュを作製するために、その最適コーティング条件(界面活性剤の種類、CNT 濃度、ディッシュへの作用時間)を確立し、細胞培養特性(細胞毒性、細胞活性、細胞形態のSEM 観察、細胞付着性)を調べた。細胞活性、細胞増殖率ともコラーゲンコートディッシュにやや劣るものの、ほぼ同等の細胞増殖能を示し、通常、細胞剥離に用いられるトリプシン処理でも剥離しにくい、高い細胞付着性を持つことが確認され、特徴的な新しい細胞培養用担体としての可能性が示された。

(19)組織再生用炭酸アパタイトコンポジットの合成と物理化学的特性評価(岡崎)

ナノ炭酸アパタイト結晶を合成し、物理化学的性状をX線回折、FT-IR, SEM, HR-TEM, ICP等を用いて分析した。化学分析における炭酸含有量の増加に伴うPの減少、FT-IRの CO_3^{2-} ピークの増大、(300)X線回折線の高角度側へのシフトから、炭酸イオンはアパタイト結晶の主に PO_4^{3-} と置換すること、また結晶性が低下し結晶形態も六方晶形状から不定形に移行することが見出された。炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジは細胞の侵入に十分な空隙を保持し、骨芽細胞様細胞は良好な接着性と侵入性を示した。このナノアパタイトコンポジットは三次元培養や代謝性調節に有効である。

(20)骨置換性ナノ炭酸化アパタイトバルク体の作製(石川)

生体骨の無機主成分であるナノサイズ炭酸アパタイトは骨誘導性や骨置換性等の特性を有するが、高温で熱力学的に不安定で焼結が不可能である。

任意の形状のバルク体の作製を可能にするためには、生体内環境では炭酸アパタイトが熱力学的最安定相であることから、無脊椎動物の硬組織であり熱力学的不安定相でもある炭酸カルシウムを中間体として溶解-析出反応を利用する方法が考えられる。しかし炭酸カルシウム圧粉体をリン酸塩水溶液に浸漬すると崩壊し形態を保持できなかった。そこで、水酸化カルシウムを一軸成形後、二酸化炭素に暴露することにより、水酸化カルシウム表面の炭酸化に伴う粒子間結合が進行し、カルサイト結晶からなる炭酸カルシウムブロックが形成された。このブロックは水溶液に浸漬しても崩壊せず、結晶子は262-306 nmと試薬カルサイト834 nmに対し極めて小さく、これを中間体としてナノサイズ結晶子炭酸アパタイトブロックが形成される可能性が高い。

(21)ナノアパタイトの機能性転換(亘理、横山)

アパタイトは通常(マクロサイズでは)、新生骨形成を誘導しすぐれた骨誘導性を示すものの材料自体は非吸収性で体内に恒久的に残留するから、構造材としてのインプラントに適しているが、それ自身は骨に置き換わることはない。しかし50nm以下のナノ微粒子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に機能性が転換し、新たな機能を発現する。

図21はナノアパタイト・コラーゲンコンポジットをラット大腿骨骨髓腔内に埋入した例で、8週後の状況である。埋入直後、視野全体に存在していたコンポジットに、骨芽細胞と破骨細胞が出現し協働的に作用しながら、ナノコンポジットの貪食と新生骨形成がともに進行し、8週後には吸収されつつある材料と新たに形成された骨が不可分的に存在する状態になり、結果としてナノアパタイトコンポジットが骨置換性としての機能性に働いている。アパタイトを一部炭酸化すると結晶性がさらに低下し、化学的な溶解性も増大することと相俟って骨置換がさらに容易に進行する。このような現象は生体反応性に対する微粒子サイズ依存性とそのメカニズムを理解していると、よく理解できる。

V.1.2 骨

(22)骨置換性ハニカム構造 β -TCPによる新生骨誘導(久保木)

組織再生には、①細胞、②細胞外マトリックス(ECM)、③制御因子、④栄養供給、⑤力学刺激という5大要素の統合が必要であり、そのうちECMについては、多数の直線状トンネルを

有するハニカム構造が、骨・軟骨・血管の再生医療に有効である。本研究ではハニカム構造を骨置換性材料の β -TCPに適用し、①吸収性骨補填剤、②血管と骨の新生誘導、および③「人工細胞外マトリックス幾何学」が μm から nm オーダーへ変化したときの構造依存性研究に有用であることを見出した。

V.1.3 歯質

(23)BMPによる歯周組織再生へのナノマテリアル適用の試み(川浪)

有力な歯周組織再生療法としてBMP投与が考えられるが、硬組織形成と同時に象牙質面の吸収も起きるため、BMP濃度依存性と象牙質表面構造を形成する脱灰液依存性、およびビスフォスフォネートによる破骨細胞抑制の影響を検討した。象牙質面を脱灰後、BMP-2を塗布すると、破骨細胞およびカップリング現象が活性化して硬組織形成が主となるが、破骨細胞と骨芽細胞の両方がきわめて近傍で活性化した。

(24)歯根セメント質の修復機能誘導へのナノマテリアル適用の可能性(八若)

乳歯歯根吸収と局所修復機構を明らかにするために、光学顕微鏡ならびに透過型電子顕微鏡による組織学的観察を行った。歯根吸収は健全乳歯でも部分的に生じ、炎症など病的歯根吸収では歯根象牙質の深部まで吸収が及んでいる。吸収部位へ修復性セメント質を添加すると、歯根表面形態はある程度修復されるが、健全セメント質とは異なり、空隙を有しコラーゲン線維が少なく、多数の細く短い細線維と微小顆粒が存在する比較的疎な構造を示した。局所的な修復機構は存在するが十分ではなく、担体としてナノ物質を適用することにより、確実に速やかな修復機構を発現し歯根再生に導く可能性を検討した。

V.2 環境浄化

(25)CNTによる揮発性有機化合物(VOCs)の吸着除去(古月)

複雑な環境物質から選択的に汚染物質を捕集し濃縮する方法として、ベンゼン環をもつ物質と強い親和性を有するCNTに注目し、揮発性有機化合物(VOCs)の吸着・除去について検討した。CNT充填カートリッジを通過後、GC-MSを用い定量測定することにより、23種類のVOCs中、1,4-ジクロロベンゼン、*o*-キシレン、*m,p*-キシレン、トルエンおよびベンゼン、即ち、芳香性VOCsが優先的に吸着・除去されることを見出した。福井フロンティア軌道理論に基づく計算か

ら、吸着性は吸着化合物のLUMOおよびHOMOのポテンシャルと密接に関連することがわかった。

V.3 バイオ医療用装置開発

(26)CNTカソード電界放出型ミニチュアX線源によるガン細胞照射効果(奥山)

CNTをカソードとする電界放出電子をターゲットに衝突させX線を発生させる電界型X線源は口径をミリメートル次元に小型化できるため内視鏡との一体化により、体腔内腫瘍の直接X線照射が可能となる。この、“ミニチュアX線源によるナノ放射線治療”の実現に向け、本研究では電界型X線の有効性確認実験を行った。培養ガン細胞への照射により、アポプトシスの誘起と細胞死が確認された。

(27)生体内物質動的化学マッピングに向けたX線光電子顕微鏡の開発(朝倉)

実験室規模高輝度X線源と3次の収差まで補正できる多極子Wien filterを組み込んだ新しいX線光電子顕微鏡(EXPEEM)の開発を行った。本装置は光軸を直線に保ちながら、顕微像を測定し、化学状態の分析が可能であり、Au/Taのテストサンプルで、元素マッピング像の取得に成功した。

(28)生体観察用TEMエンバイロメンタルセルの開発(大貫)

生体の含水組織の透過電子顕微鏡観察の方策として、環境セル(エンバイロメンタルセル)があるが、その成否は電子ビームに対する透過性で強度の高い真空隔膜の開発にかかっている。改良を加え、大気圧でも観察可能な装置の開発に成功し、含水性物質の観察を行った。

D. 考察

(1)ナノキシコロジー

(1.1)比表面積効果←イオン溶出性材料

マイクロ/ナノサイズ化の効果として最も顕著で通常論じられるのが、比表面積効果である。マクロで有害性を示すBe, Cd, V, Mn, Ni等は溶出したイオンが体内に吸収摂取され毒性を示すが、微粒子サイズの減少とともにサイズに反比例して比表面積が増大するから、化学反応もまた増大し、毒性は著しく昂進する。マクロで金属アレルギーを示すNiを $0.5\mu\text{m}$ 微粒子にして埋入すると1年後、腫瘍が生成した図11の結果は典型的な比

表面積効果の例である。

短期的 *in vitro* 細胞毒性試験で毒性を示す材料は概ねこの範疇に属し、急性の強い毒性として発現する点で重篤であり、またきわめてわかりやすい。これは図1において生体とは無関係に発生する材料自体に由来する効果である。

(1.2)物理的微粒粒子効果

一方、図10のTi微粒粒子ではやや様相が異なる。Tiではイオン溶出しないにも関わらず、サイズが減少すると刺激性が増大する。

これは物理的微粒粒子サイズ・形状が貪食や細胞膜刺激を誘発して活性酸素やサイトカインの産生を促し、その結果として炎症を生ずるためであり、材料の化学的特性とは無関係に現れる、材料に非特異的な物理的効果である。その発現機序は図1における材料と細胞・組織間の相互サイズ関係に由来し、生物学的プロセスを経て生起する刺激性効果である。

これはNi微粒粒子でも起きるがイオン溶出に基づく比表面積効果による毒性のほうがはるかに強いと隠れてしまうことが多い。しかしマイクロサイズでは刺激性が認められなかった bioactive, bioinert 材料ではマイクロ/ナノサイズ化とともに単独で生起し、純粋なサイズ効果として顕現化することになる。

in vitro, *in vivo* 試験の結果を総合すると、微粒粒子サイズと生体適合性の関係は次のようにまとめられる。

微粒粒子サイズ：	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。

(1.3) *in vitro* 試験による細胞毒性・生体反応

素過程検索と *in vivo* 組織反応性

上記の材料非特異的、物理的刺激性効果は3 μm ~ 500nm にかけて最も強くなる。bioactive, bioinert 材料の場合、その毒性の程度は *in vitro* 試験によれば細菌内毒素に比べると 1/1000 ~ 1/10000 以下と低く、刺激性は急性の強いものではなく、体内においても少量短期であれば問題ないものと思われる。ただしこれですべての可能性を判断することはできない。

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るが、効果の一側面を一つの尺度で表すものであり、*in vivo* での様々な生体組織系に及ぼす波及効果を網羅するものではない。*in vitro* 細胞毒性試験のみではアスベスト禍のような可能性は見落とすことになる。即ち *in vitro* では細菌内毒素に比べればはるかに低い毒性ではあるが、*in vivo* の組織内では貪食を誘発し、金属微粒粒子の場合には細胞死を導いて局所に残留し長期間炎症を継続する点で注意が必要である。長期蓄積するような条件下では炎症が継続して慢性化し、20 ~ 30 年かけて中皮腫を発症するに至るアスベスト禍のような効果も可能性として考えられる。

こうしたナノトキシコロジー問題に対応するためには、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。

(1.4)ナノパーティクルの体内侵入

微粒粒子サイズがさらに小さく約 200nm 以下になると物理的微粒粒子サイズ刺激性はむしろ低下する。この nm サイズでの刺激性の減少はナノテクのバイオ応用の観点からは一見都合が良さそうに見える。例えば DDS の呼吸器系を通じての体内薬剤投与およびマクロファージに捕捉されずに癌患部に特異的に到達結合するためには好都合である。

しかし一方、bioinert 材料では細胞内毒素等の強い毒性、抗原抗体反応、非自己血液や臓器に対する免疫拒否反応などの重篤な急性反応は起きず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を許してしまう可能性がある。例えば大食細胞（マクロファージ）は肺に入る異物を処理するが、50nm 以下の粒子に対する反応が低下する結果から、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、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がある。むしろ一部位における炎症反応で影響を局限したほうが、全身にリスクが拡散しないと考えられる。

(1.5)呼吸器系への強制曝露試験

実際ラットへの強制曝露試験を行うと、化粧品などに含まれる 30nm の TiO₂ 粒子は、病理組織的所見から肺胞に多数到達、集積し、肺胞から血管内への移行が確認され、さらに図5のように全身の XSAM-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。

ナノ粒子は呼吸器系のほかにも消化器系を通し

ても体内に取り込まれるが、材質に応じてさらに血流・リンパ系による全身循環を経て、フィルター機能により特定臓器へ蓄積するもの、臓器で濃縮後、尿など体外排出されるもの、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発ガン等の二次的な障害を引き起こすもの等、体内での動態は様々である。

例えば生体組織中で食食を誘発した微粒子は金属チタン(Ti)では細胞死を誘導して食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他組織へ遊走する可能性がある。

(2)一般大衆商品へのナノパーティクルの使用の増大

しかしナノパーティクルは化粧品や医薬品、健康関連商品など、既に人体や生活関連商品に導入され始めており、もし今後国民が日常的に使用する一般大衆商品で大量に使用されることになればその影響は重大である。

①図5に示したように、従来から化粧品には白色感の色調付与や紫外線カットのために約30nmのTiO₂が使われている。ペースト状や粘性を有する塗布剤の使用様態からは体内侵入の可能性はあまり問題にならないと思われる。

しかし最近現れてきたものにはより直接的に人体に投与するものがふえてきている。これには販売の際のイメージとして、ナノテクノロジーの高機能、最新、最高級という語感を利用するものが多い。例えば、

②健康関連商品の服用剤として販売されているナノ白金微粒子コロイドがあり、③歯科治療用コンポジットレジンでは従来サブミクロン大では含まれていたフィラー(複合材料充填粉末強化剤)に、ナノサイズの微粒子も含有させた新商品が売り出されはじめたが、咬合咀嚼時の摩耗脱落によって消化器系から体内に入る可能性があり、一方材料特性への効果としてはほとんど不用のものである。④また抗菌性を付与するために、銀(Ag)ナノ微粒子入り洗剤や洗濯機が現れはじめ、限局的な使用に留まる限り影響は小さいと思われるが、日常一般大衆商品として各社に広まり、大量に排水が環境に放出されれば、かつての水銀、カドミニウム、ビスフェノールAほかの環境ホルモン物質の時と同様な環境汚染、生態系・種の保存環境の攪乱、ひいては胎児・乳児への影響の恐れも可能性として考えられ得る。

(3)安全性試験の欠如と体内動態解明の必要性

こうした製品の人体への効果・影響は必ずしもよく調べられているわけではない。またナノテクノロジーやナノマテリアルの危険性に関する報道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ているものが多い。安全性や機能性の効果に関する検討には科学的根拠に基づく対応が求められる。

アスベスト禍のようなナノトキシコロジー発現の予防、あるいはナノテクノロジーのバイオ応用、ナノメディシン開発にあたっては、材料がマイクロ/ナノサイズ化したときの生体反応性、体内に侵入したナノパーティクルの動態をあらかじめ明らかにする必要がある。

本研究では体内動態可視化を①全身・臓器、②組織、③細胞の各レベルで実施した。

(4)体内動態

(4-1)全身動態可視化の2方法と微粒子動態

体内動態イメージングの最初に位置付けられ、最重要核をなすのが全身レベルでの動態の可視化である。本研究では以下の2方法を適用・開発した。

(4-1-1)XSAM 元素マッピング法

XSAM(図2)は分解能100 μ m程度で信号強度も高くはないが、ピーク/バックグラウンド比(P/B)が高く時間は要するが、軟組織中のCaなど100ppmレベルの元素も検出可能で、特にTi, Fe, Ni, Cu, Ag等の中重元素を高感度にマッピング表示できる。さらにマウスのような100mm大の広領域サンプルから無処理のまま大気中で分析が可能であり、全身動態表示を可能にするには適している。

①微粒子動態の時間依存性

尾静脈からの血流直接投与試験では、いずれの微粒子もおおむね、投与直後に肺に到達し、その後肝臓へ、さらに脾臓へ到達し、腎臓では検出限界以下であった。TiO₂では肺に到達後、十数時間滞留する間に、数時間かけ肝臓に、数十時間かけ脾臓に次第に移行した(図7)。

②微粒子動態の材料依存性

TiやTiO₂では通常の肺から肝臓への移行が認められるのに対し、FeやPtでは脾臓への顕著な蓄積が認められた(図6)。

(4-1-2)レーザー/マス・マッピング法(イメージング質量分析: MALDI-TOF-MS)

XSAM 元素マッピングでは生体中の糖鎖、蛋白質、あるいは純炭素のフラーレン(C₆₀)、CNT等の分布表示はを生体内で識別検出するこ

とは、どちらも構成元素が同一種Cからなるため不可能であり、別の原理に基づく方法の開発が必要である。レーザー/マス・マッピング法(図4)は分子量で分子種を識別する方法でありこれらの物質の検出には有効性が高い。

最終的には検出用マーカーとして、細胞のレセプターや癌患部等の抗原に特異的に結合する糖鎖リガンドを側鎖基にもつ水溶性フラーレン(C₆₀)誘導体を開発し(図3)、体内投与・ターゲットに結合後、レーザー照射により蒸散したターゲット物質から乖離フラーレン単体(図3)を検出し2次元分布像を得る(図4)ことを目標とするものであるが、本年度は第一段階としてフラーレン自体の体内検出をめざし水溶性フラーレンマーカーとレーザー/マス法の開発を行い、肝臓中の解離フラーレンイオンの2次元分布像の描出を実現した(図9)。

(4-2)体内動態—軟組織内埋入試験

(4-2-1)イオン溶出性材料—Fe, Ni

① Fe: Feはイオン溶出しやすいにもかかわらず、微粒子でも短期的にはin vitroでのLDH(乳酸脱水素酵素)・活性酸素・サイトカイン産生試験, in vivoでの組織反応性試験ともTiに類似した生体反応性を示して比較的影響は小さい。しかし長期埋入試験では持続的に大量のイオン溶出を継続するため、線維性結合組織で被包化されるも、6ヵ月後ではナノ粒子やイオンはその障壁を越えて拡散し、析出物として周囲組織に沈着した(図11)。3匹中1匹で腫瘍の発生が認められた。in vitro試験のみでは安全性について判定できない1例である。

② Ni: マクロでNiはアレルギー出現頻度第1位を占める金属であるが、0.5 μ m粒子を埋入すると強い有害性を示し、埋入期間とともに炎症、壊死、1年後には腫瘍形成と遺伝子レベルでの強い傷害を生じた(図11)。

以上のFe, Niでの有害性の著しい昂進は主としてイオン溶出に及ぼす比表面積効果によるものである。

(4-2-2)非イオン溶出性材料(Ti)とサイズ依存性

100 μ m以上では各粒子が個別に線維性結合組織で被包化されマクロと同じ生体親和性を示す。100 μ m以下、粒径の減少とともに刺激性が増加し、50~10 μ mの場合、線維性結合組織と炎症性細胞浸潤の両方が分散微粒子群中に形成され、慢性的に炎症が継続し凝集化は起こらない。

3~0.5 μ m微粒子では埋入時間とともに経時的に凝集化が進行する。これは生体の主たる反応

が貪食であり、貪食→細胞死→局所残留の生物学的濃縮サイクルを順次繰返してミクロでの凝集化が進行し、マクロ的にも分散微粒子群が次第に凝集するとともに、粒子群周囲に線維性結合組織が形成され、その外圧と、粒子群内部の貪食・細胞死・吸収による減圧により、さらにマクロでの凝集化が進行する。

この組織レベルにおける微粒子動態のサイズ依存性は材料に非特異的な物理的微粒子効果によるものであり、生物学的プロセスで生起する。

(5)CNTの生体適合性とバイオ応用性

(5-1)CNTと安全性—アスベストとの共通性

電子、化学分野で注目されているCNTは直径がnmオーダーで長さが μ m以上の繊維状・針状微粒子であり、欧米からは形状の類似性から、アスベストのような重大な有害性があるのではないかという指摘なされている。

アスベストの発ガン性の要因として考えられる特性をCNTについて比較すると、以下の点で共通点がある。

- ①肺胞に到達し得る微粒子サイズである。
- ②繊維状ないし針状微粒子であり、アスペクト比が大きい。
- ③体内で非分解性である。

(5-2)CNTとアスベストの形態・挙動の相違点

CNTは材質的には純炭素で基本的にはbioinert(生体不活性)であり、イオン溶出等の化学的特性の影響は小さく、微粒子サイズや形状等の物理的特性の影響(上記①、②が該当)が刺激性の主要な要因になると考えられる。

アスベストとCNTを混在した図18からわかるように、結晶形態はアスベストではほとんど湾曲することのない顕著な針状直線性を示すのに対し、CNTでは屈曲性に富み柔軟であり、単層CNT(SWCNT)では1 μ m大の細菌を1周するように巻き付く様子が観察される。また表面化学特性もアスベストは親水性で容易に分散し飛散しやすいのに対し、CNTでは疎水性で凝集しやすく、また糖鎖・蛋白質へのaffinity(親和性)、細胞附着・伸展性、体液中でのアパタイト析出性等、バイオ応用に適した数々の特性を見出しており、やや異なる挙動を示す。

(5-3)CNTの生体反応性

①サイズ依存性

他のbioactive, bioinertな微粒子と同様、in vitro細胞毒性試験において長さ1 μ m大のものよりもより短い600nm, さらに200nmのほうが炎

症性サイトカイン IL-1 β , TNF- α の産生が低くなる結果が得られている。in vivo 試験でも 1 ~ 0.5 μ m よりも長さの短い 200nm のほうが、早く細胞内に貪食されてライソゾームに取り込まれ、起炎性が低いことが観察される。

2年程度までの短中期的埋入試験では CNT のサイズや結晶構造に依存して被包化や肉芽組織形成等、差異はあるものの強い炎症や腫瘍形成等は認めていない。

②結晶構造依存性

細胞刺激性や起炎性は単層 CNT、多層 CNT、CNF 等の結晶構造にも依存性を示し、特に円錐型グラフェンシートが長さ方向に積層した構造の CNF(カーボンナノファイバー：図 1 4 a)ではグラフェンシート末端が表面に露出し官能基と反応し得ることや、図 1 4 b のライソゾーム内での破折断片化の透過電顕像、図 1 5, 1 6 の破折断片化の進行により結晶構造の乱れた結晶破片の超高压電顕高分解能観察像に見られるように、機械的に長さ方向に分断されやすい一種の生分解性挙動を示し、起炎性が低く生体内で処理されやすい傾向がある。

(6)ナノサイジングによる機能性転換

①ナノアパタイトの機能性転換

アパタイトは通常(マクロサイズでは)、新生骨形成を誘導しすぐれた骨誘導性を示すものの、材料自体は非吸収性で体内に恒久的に残留するから、構造材としてのインプラントに適しているが、それ自身は骨に置き換わることはない。しかし図 2 1 のように 50nm 以下のナノ微粒子(ナノアパタイト-コラーゲンコンポジット)にすると生分解性に変化し、骨欠損部(図 2 1 では骨髄腔)に埋入すると、破骨細胞によるナノコンポジットの貪食と骨芽細胞による新生骨形成がともに協働的に発現し、吸収されつつある材料と新たに形成された骨が不可分的に共存し、埋入期間とともに次第に新生骨に占められる部分が増加し大部分が骨におおわれるようになる。結果として生体に吸収されつつ骨再生を促す骨置換性に機能性が転換し、新たな機能を発現する。ハイドロキシアパタイトを一部炭酸化すると結晶性がさらに低下し、化学的な溶解性も増大することと相俟って骨置換がさらに容易に進行する。

②ナノサイジングと生体機能性誘導

これは生体中で常時起きている骨成熟化あるいは細胞・組織の代替わりとまさに同じプロセスであり、事実、歯や骨の硬組織はナノアパタイトか

ら形成されている。こうしたナノ微粒子の物理的サイズ効果に起因する生体反応性は生物学的に貪食・炎症を誘発して生物自体の機能性を誘導するという点で、デメリットも含めた広い意味での bioactive(生体活性)特性とも言える。ナノ微粒子が存在する各部位の状況に応じて、生体防御機構を誘導する刺激性・毒性という一見デメリットとして働き、別の局面では組織再生というメリットに作用する機能性転換を引き起こす。材料のナノサイジングは生体反応機構の本質に関わる根源的な現象である。

E. 結論

体内動態可視化を①全身・臓器、②組織、③細胞の各レベルで実施し得られた主な結論は以下のようである。

1. 体内動態-XSAM マッピング

- (1)強制曝露試験により 30nmTiO₂ は肺胞から血中に移行し全身に拡散した。
- (2)尾静脈からの血流直接投与試験では、いずれの微粒子もおおむね、投与直後に肺に到達し、その後肝臓へ、さらに脾臓へ到達した。腎臓では今回検出限界以下であった。
- (3)TiO₂ では肺に到達後、十数時間滞留する間に、数時間かけ肝臓に、数十時間かけ脾臓に次第に移行した。
- (4)Fe や Pt では脾臓への蓄積が顕著であった。

2. 体内動態-レーザー/マス・マッピング

- (5)元素マッピングでは検出不可能な生体中での蛋白質、炭素化合物の検出法として、水溶性フラウレンをマーカーとするレーザーアブレーション/マススペクトルマッピング法を開発した。炭素化合物の検出例として、肝臓中の解離フラウレンイオンの 2次元分布像の描出を実現した。

3. 体内動態-軟組織内埋入試験

- (6)イオン溶出性の Fe, Ni は埋入期間とともに、炎症、壊死、腫瘍形成に進展し、Ni ではより有害性が強かった。これらでは比表面積効果が顕著である。
- (7)イオン溶出が無視できるほど低く物理的サイズ効果が支配的な Ti 微粒子では、10 μ m 以下の微粒子の場合、貪食→細胞死→局所残留を繰返し炎症が継続するとともに、経時的に凝集化が進行した。これは材料に非特異的な物理的微粒子効果であり、生物学的プロセス

スで生起する。

100 ~ 10 μ m サイズの場合、凝集化は特に見られず、粒子群中に炎症性細胞浸潤と線維性結合組織がともに形成され、慢性的に炎症が継続した。

- (8)CNT や CNF では長さが 1 μ m 大のものよりもより長さが短いほうが貪食が容易で起炎性も低い。
- (9)CNT に比べ CNF のほうが経時的にライソゾーム内で破折断片化が進行して一種の生分解挙動を示し、生体内で処理されやすく起炎性が低い傾向がある。
- (10)超高压電顕を用い生体組織中での CNT, CNF の高分解能観察を可能にした。

4. ナノ粒子の安全性・機能性

- (11)アスベストは顕著な直線状微粒子形態を示しほとんど湾曲することがなく、また親水性で容易に分散するのに対し、CNT では屈曲性に富み、疎水性で凝集しやすい点で、やや異なる挙動を示す。
- (12)アパタイトはマクロサイズでは骨誘導性を示すものの非吸収性であるが、約 50nm のナノ結晶からなるナノアパタイト-コラーゲンコンポジットは破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を誘導し、その結果、骨置換性に機能性の転換を起し、新たな機能を発現する。

5. 単細胞アッセイ、人工関節摩耗粉、バイオ用試料・装置等

- (13)単細胞個体(ゾウリムシ)をバイオアッセイ系とし CNT と磁性ナノ粒子の細胞内動態・毒性評価を行った。
- (14)人工関節摩耗粉の発生シミュレーション試験、摩耗粉性状評価、マクロファージ遊走阻止因子ワクチンによる骨溶解抑制、耐摩耗性インプラント材料の開発を行った。
- (15)CNT とアスベストの性状比較・細胞毒性評価、バイオ用ナノ粒子・コンポジットの作製・機能性付与、CNT の揮発性有機化合物の選択吸着による環境浄化、組織再生用スカフォールドへの応用、CNT 電界放出型ミニチュア X 線源、光電子顕微鏡、生体観察用 TEM 雰囲気セルの開発を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) F.Watari, K.Tamura, A.Yokoyama, K.Shibata, T.Akasaka, B.Fugetsu, K.Asakura, M.Uo, Y.Totsuka, Y.Sato, K.Tothji: Handbook of Biomineralization, Vol.3, Ed.E.Bauerlein, Wiley-VCH, Weinheim, p. , (2007)
- 2) Yuhe ZHU, Fumio WATARI : Surface Carbonization of Titanium for Abrasion-resistant Implant Materials, Dent.Mat.J. 25 (2) , p.244-252, 2007
- 3) F.Watari, M.Inoue, T.Akasaka, N.Sakaguchi, H.Ichinose, M.Uo: Comparison of Morphology and behavior of carbon nanotubes and asbestos, Proc.6th Asian BioCeramics Symp.2006, p.142-145, 2006
- 4) M.Uo, K.Asakura, T.Akasaka, F.Watari, A.Yokoyama, T.Kohgo, Y.Totsuka: Distribuion and chemical state analysis of rarely contained metallic elements in biological tissues, Proc.6th Asian BioCeramics Symp.2006, p.115-117, 2006
- 5) Liao S, Watari F, Zhu Y, Uo M, Akasaka T, Wang W, Xu G, Cui F.: The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane in vitro, Dent Mater. 2006 Nov 7
- 6) Wang W, Watari F, Omori M, Liao S, Zhu Y, Yokoyama A, Uo M, Kimura H, Ohkubo A.: Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006 Dec 20
- 7) Fumio Watari, Susan Liao, Atsuro Yokoyama, Mamoru Omori, Noboru Ohata: FGM's for Biomedical Applications, Advances in Science and Technology 45, Ed.P.Vincenzini et al., p.1124-1133, 2006
- 8) 亘理文夫：材料のナノサイジングと生体反応性、バイオマテリアル-生体材料- 24 (5) , 300-310, 2006
- 9) 佐藤義倫、宇尾基弘、横山敦郎、柴田健一郎、亘理文夫、田路和幸：カーボンナノチューブと金属内包カーボンナノカプセルの毒性評価、表面 44 (3) , 87-103, 2006
- 10) 佐藤義倫、横山敦郎、柴田健一郎、亘理文夫、田路和幸：炭素, 225, 364-372, 2006
- 11) M.Ushiro, K.Uno, T.Fujikawa, Y.Sato, K.Tothji, F.Watari, W.Chun, Y.Koike, K.Asakura: X-ray absorption fine structure (XAFS) analyses of Ni species trapped in graphene sheet of carbon nanofibers, Phys.Rev.B 73, 144103/1-11 (2006)
- 12) N.Aoki, A.Yokoyama, Y.Nodasaka, T.Akasaka, M.Uo, Y.Sato, K.Tothji, F.Watari: Strikingly Extended Morphology of Cells Grown on Carbon Nanotubes, Chem.Let. 35 (5) , 508-509, 2006
- 13) M.Uo, K.Asakura, T.Kohgo, F. Watari: Selenium Distribution in Human Soft Tissue Determined by Using X-ray Scanning Analytical Microscope and X-ray Absorption Fine Structure Analysis, Chem.Let.35 (1) , 66-67, 2006
- 14) 赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫：糖鎖工学と歯学、北海道歯学雑誌 27 (1) , 41-44, 2006