

- 15) F.Watari, M.Inoue, T.Akasaka, N.Sakaguchi, H.Ichinose, M.Uo: Archives of BioCeramica Research Vol.6 (Proc.Asian BioCeramics Symp.2005), p. , (2005)

## 2. 学会発表

- 1) 宇尾基弘、赤坂司、亘理文夫、朝倉清高、横山敦郎：XAFSを用いた金属インプラント周囲組織中の微量金属元素の状態分析、第18回代用臓器・再生医学研究会抄録集, p.79, 2006  
H18/1/20, 札幌(北海道大学医学部第4講義室)
- 2) 宇尾基弘、赤坂司、亘理文夫、朝倉清高：歯科用合金を含む口腔組織中のセレンの分布と状態分析、平成17年度(社)日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会セミナー「顕微鏡科学への招待」プログラム・予稿集, p.13, 2006  
H18/2/28, 札幌(北海道大学学術交流会館小講堂)
- 3) 亘理文夫：人工材料の生体反応性に対する各種顕微鏡的アプローチ、日本顕微鏡学会関東支部第30回講演会予稿集『顕微鏡技術が拓く新たなナノサイエンス』p.11, 2006  
H18/3/4, 東京(東京工業大学大岡山キャンパス)
- 4) 朱禹赫、王蔚、宇尾基弘、赤坂司、菅原敏、横山敦郎、亘理文夫：表面炭化チタンの生体材料特性、第47回日本歯科理工学会学術講演会・総会講演集, p.175, 2006  
H18/4/22-23, 東京(タワーホール船堀)
- 5) 亘理文夫(オーガナイザー)：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」(課題番号：H16-化学一般-006)平成18年度・夏期・第1回研究目標策定発表会、H18/5/16-17, 支笏湖
- 6) Fumio Watari, Susan Liao, Atsuro Yokoyama, Mamoru Omori, Noboru Ohata : Abst. FGM's for Biomedical Applications, CIMTEC 2006, p.59-60, 2006  
2006/6/4-9, Italy, Acireale
- 7) 亘理文夫(オーガナイザー)：第2回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会 抄録集, p.1-45, 2006  
H18/6/22-23, 札幌
- 8) 亘理文夫、廖素三、崔福齋：骨組織再生用傾斜機能型GTR膜の試作、第18回傾斜機能材料シンポジウム<FGM 2006>講演要旨集, p.30, 2006  
H18/6/29-30, 松江(島根県産業技術センター)
- 9) 亘理文夫：カーボンナノチューブ・微粒子の生態影響、未踏科学技術協会ナノ粒子研究会第36回講演会「ナノ粒子のリスク評価について」資料, p.5-14, 2006  
H18/7/7, つくば(独立行政法人国立環境研究所)
- 10) 青木尚史、横山敦郎、野田坂圭伸、赤坂司、宇尾基弘、佐藤義倫、田路和幸、亘理文夫：カーボンナノチューブスキャホールドと細胞反応、第31回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集, p.105, 2006  
H18/7/12-14, 津(三重県総合文化センター)
- 11) 赤坂司、青木尚史、宇尾基弘、亘理文夫：柔軟性カーボンナノチューブによるストレプトコッカスミュータンスの補足とその増殖、第31回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集, p.106, 2006  
H18/7/12-14, 津(三重県総合文化センター)
- 12) 赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫：人工複合糖質高分子による Streptococcus mutans の増殖阻害、平成18年度日本歯科理工学会 北海道・東北支部夏期セミナー プログラム, p1-2, 2006  
H18/7/22, 盛岡(岩手県歯科医師会館)
- 13) 阿部薫明、森山英樹、新倉謙一、Fei Feng、門出健次、西村紳一郎、亘理文夫：バイオ応用を目指した糖鎖結合フラーレンの作製、平成18年度日本歯科理工学会 北海道・東北支部夏期セミナー プログラム, p.1-2, 2006  
H18/7/22, 盛岡(岩手県歯科医師会館)
- 14) Fumio Watari, Hideki Ichinose, Atsuro Yokoyama, Yoshinori Nodasaka, Tsukasa Akasaka: Carbon Nanotubes in Tissue Observed by High Voltage Electron Microscopy, Proc.16th Inte.Microscopy Cong. (IMC16), p.1276, 2006  
9/3-8/2006, Sapporo (Sapporo Convention Center)
- 15) Susan Liao, Guofu Xu, Fumio Watari: Preparation of Nano-hydroxyapatite/MWCNTs Biocomposite, Proc.16th Inte.Microscopy Cong. (IMC16), p.1905, 2006  
9/3-8/2006, Sapporo (Sapporo Convention Center)
- 16) 亘理文夫：サイズに依存する材料の生体反応—マイクロ/ナノサイジング効果—、第114表面技術協会回講演大会講演要旨集, p.347-350, 2006  
H18/10/13-14, 札幌(北海道大学)
- 17) Fumio WATARI, Susan LIAO, Fuzai CUI: Functionally Graded GTR Membrane for Bone Tissue Regeneration, Abst. United Kingdom-Japan (The University of Birmingham- Hokkaido University) Symposium on Varieties of Biomineralization and their Nano-Medico-Environmental Applications, 2006  
10/16/2006, Sapporo (Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University)
- 18) Motohiro Uo, Morimichi Mzuno, Yoshinori Kuboki, Fumio Watari: Properties and cytotoxicity of water soluble Na2O-CaO-P2O5 glasses, ibid.
- 19) M.Uo, K.Akasaka, F.Watari, A.Yokoyama, T.Kohgo, Y.Totsuka: Distribution and Chemical State Analysis of Rarely Contained Metallic Elements in Biological Tissues, Prog.Abst. Asian BioCeramics Symposium 2006 (ABC2006), p.17, 2006  
11/7-10/2006, THAILAND (Bangkok)
- 20) F.Watari, M.Inoue, T.Akasaka, N.Sakaguchi, H.Ichinose, M.Uo: Comparison of Morphology and Behavior of Carbon Nanotubes and Asbestos, Prog.Abst. Asian BioCeramics Symposium 2006 (ABC2006), p.20, 2006  
11/7-10/2006, THAILAND (Bangkok)
- 21) 阿部薫明、森山英樹、新倉謙一、Fei Feng、門出健次、西村紳一郎、亘理文夫：任意の糖鎖を導入可能なフラーレン誘導体の設計—バイオ応用に向けて—、第28回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, p.82, 2006  
H18/11/27-28, 東京(アルカディア市ヶ谷)

- 22) 亘理文夫、田村一央：マイクロ／ナノパーティクルに対する生体反応、第 28 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, p.66, 2006  
H18/11/27-28、東京（アルカディア市ヶ谷）
- 23) 亘理文夫（オーガナイザー）：第 28 回日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム SⅧ「材料のマイクロ／ナノサイジングと生体反応」、p.66-70,  
H18/11/27-28、東京（アルカディア市ヶ谷：私学会館）
- 24) 亘理文夫（オーガナイザー）：第 3 回「ナノトキシコロジャーセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会 抄録集, p.1-33,  
H18/12/11-12、仙台（仙台ワシントンホテル）
- 25) 亘理文夫：ナノ材料の生体材料への応用と安全性、ナノマテリアルの医療・環境・衛生分野への応用と安全性研究会・第 3 回研究会 抄録集, p1-25, 2006  
H18/12/18、名古屋（独）科学技術振興機構 研究成果活用プラザ東海）
- 26) 亘理文夫：マクロとマイクロ／ナノの材料に対する生体反応、文部科学省 ナノテクノロジー総合支援プロジェクト 第 4 回分野横断スクール ナノバイオスクール「生体細胞の形態・機能観察から動的診断へ」講義資料集、文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクトセンター, p.27-41, 2006  
H18/12/20-21、東京（都市センターホテル）
- 27) 青木尚史：カーボンナノチューブの細胞培養用担体への応用、北海道歯学雑誌 27 (2), p.166, 2006  
平成 18 年度北海道歯学会秋季学術大会, H18/11/17-18, 札幌（北海道大学歯学研究科）
- 28) 朱禹赫：耐摩耗性インプラント材料用チタンの表面炭化、北海道歯学雑誌 27 (2), p.169, 2006  
平成 18 年度北海道歯学会秋季学術大会, H18/11/17-18, 札幌（北海道大学歯学研究科）
- 29) 亘理文夫：ナノテクとその健康、平成 18 年度厚生労働科学研究（化学リスク研究推進事業）シンポジウム「家庭用化学物質の安心・安全に向けた取組み」抄録集, p.28-33, 2007  
H19/1/19, 東京（食品衛生センター）および H19/2/28, 福岡（福岡市民会場）
- 30) 寺田典子、石川誠、北川善政、高山満利子、野村成規、鈴木正彦、河野牧子、郁小兵、阿蘇雄、久保木芳徳、賀来亨、宇尾基弘、亘理文夫、久保木芳徳：人工 ECM の幾何学：ハニカム長軸構造をもつ  $\beta$ -TCP における急速な血管・骨の新生誘導能について、第 19 回代用臓器・再生医学研究会総会抄録集, p.3, 2007  
H19/2/2, 札幌（北海道大学学術交流会館）
- 31) 朱禹赫、宇尾基弘、赤坂司、亘理文夫：耐摩耗性インプラント材料のためのチタンへの表面炭化物形成、第 19 回代用臓器・再生医学研究会総会抄録集, p.4, 2007  
H19/2/2, 札幌（北海道大学学術交流会館）
- 32) 阿部薫明、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫、小山千佳、久保木芳徳：金属微粒子の体内動態の可視化と生体組織への影響、第 19 回代用臓器・再生医学研究会総会抄録集, p.4, 2007  
H19/2/2, 札幌（北海道大学学術交流会館）
- 33) 赤坂司、阿部薫明、宇尾基弘、亘理文夫：人工複合糖質高分子による *Streptococcus mutans* の増殖阻害、第 19 回代用臓器・再生医学研究会総会抄録集, p.5, 2007  
H19/2/2, 札幌（北海道大学学術交流会館）
- 34) 赤木健太郎、亘理文夫、赤坂司、古月文志：単分散カーボンナノチューブを用いたハイドロキシアパタイト合成、日本分析化学会北海道支部 2007 年冬季研究発表会, p, 2007  
H19/2/6-7, 札幌（北海道大学学術交流会館）
- 35) F.Watari, A.Yokoyama, M.Gelinsky, W.Pompe: Conversion of functions by nanosizing - from osteoconductivity to bone substitutional properties in apatite, Prog.Abst.2nd Int.Symp.Interface Oral Health Science in Sendai, p.8, 2007  
2/18-19/2007, Sendai (Sendai International Center)
- 36) M.Gelinsky, A.Bernhardt, A.Lode, M.Ecker, U.Konig, A.Yokoyama, F.Watari: Biomimetic approaches to hard tissue reconstruction: mineralised collagen as artificial extracellular bone matrix, Prog.Abst.2nd Int.Symp.Interface Oral Health Science in Sendai, p.64, 2007  
2/18-19/2007, Sendai (Sendai International Center)
- 37) 亘理文夫（オーガナイザー）：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」（課題番号：H16-化学-一般-006）平成 18 年度・冬期第 2 回研究成果発表会、  
H19/3/1-2, 鳴門（ルネッサンスリゾートナルト）
- 38) 宇尾基弘、阿部薫明、赤坂司、亘理文夫：X線分析顕微鏡及びEDSを用いた生体内金属元素の分布分析、平成 18 年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会 プログラム・予稿集, p.16, 2007  
H19/3/6, 札幌（北海道大学学術交流会館小講堂）
- 39) 赤坂司、青木尚史、横山敦郎、阿部薫明、宇尾基弘、亘理文夫：カーボンナノチューブのバイオ応用、平成 18 年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会 プログラム・予稿集, p.17, 2007  
H19/3/6, 札幌（北海道大学学術交流会館小講堂）
- 40) 亘理文夫：ナノマテリアルのサイズ・形状と毒性、第 127 回日本薬学会シンポジウム S4「ナノマテリアルのリスクと社会受容」、第 127 回日本薬学会要旨集 1, p.106, 2007  
H19/3/28-30, 富山（ポルファートとやま）

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
いずれもなし

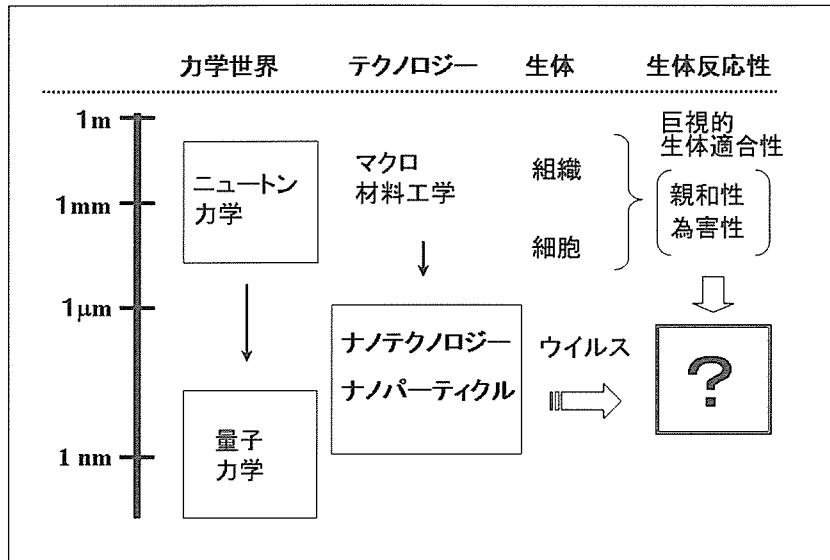


図1 ナノテクノロジーの光学世界、生体との関係、および材料のマイクロ/ナノサイジングと生体反応性の関連。

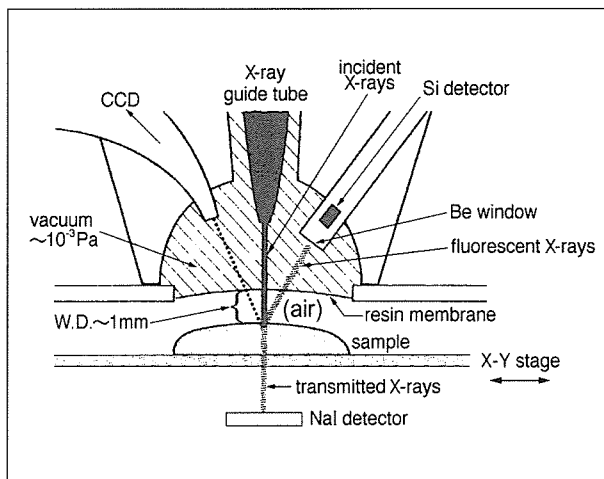


図2 X線走査型分析顕微鏡(XSAM)の装置模式図

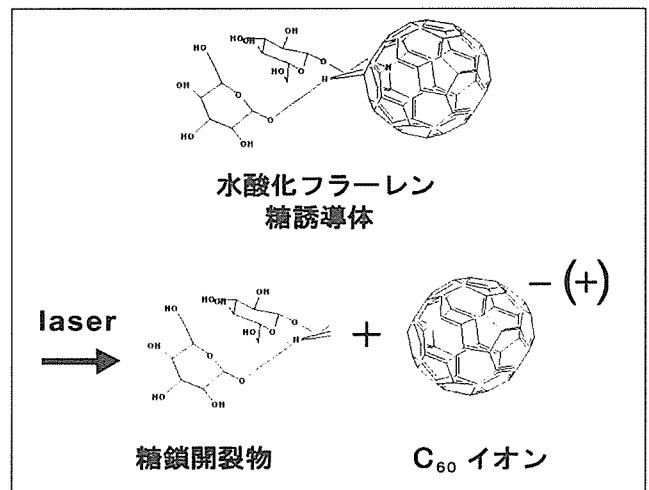


図3 レーザー照射による水酸化フラーレン糖誘導体のフラーレンイオンと糖鎖への開裂

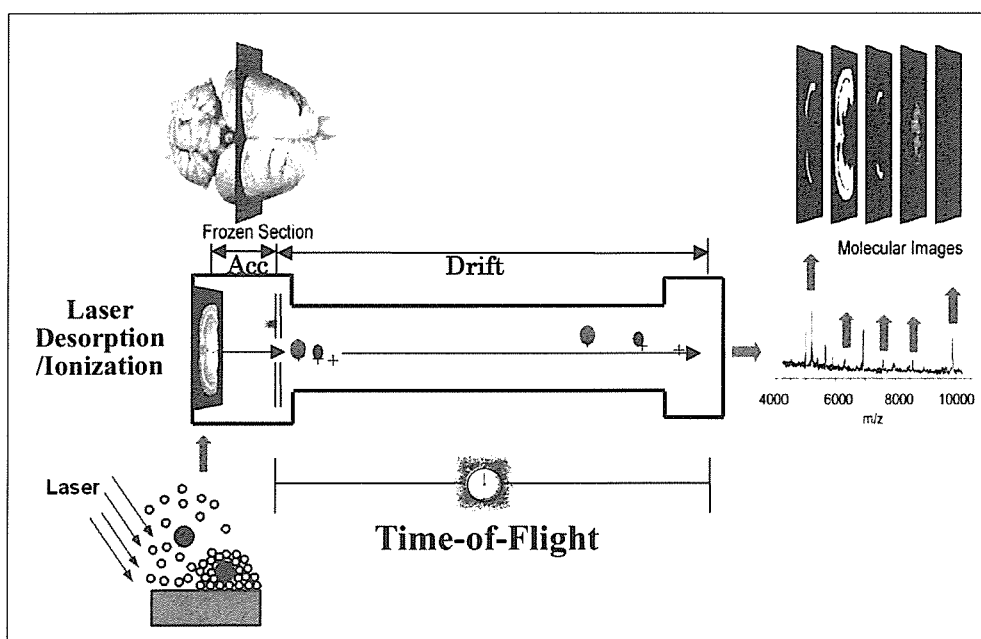


図4 レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング (イメージング質量分析: MALDI-TOF-MS)の原理。

レーザー照射により蒸散、イオン化した試料構成分子は質量分析で選別され、分子ごとに2次元分布表示する (後出 田路・佐藤ら)。

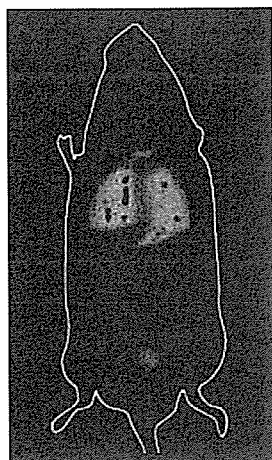


図5 ナノキシロロジー(体内侵入): 30nm TiO<sub>2</sub> 粒子の強制露曝試験後のXSAMマッピングによるラット体内の全身Ti元素分布像。  
ナノパーティクルは呼吸器系を通じて体内に取り込まれ、全身に拡散する。

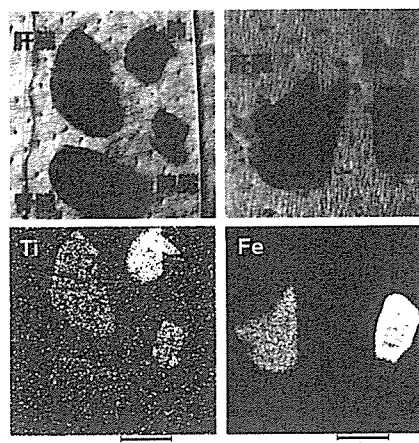


図6 微粒子蓄積の臓器間比較: マウスに金属微粒子(Ti, Fe)を尾静脈投与1日後のXSAMマッピング表示

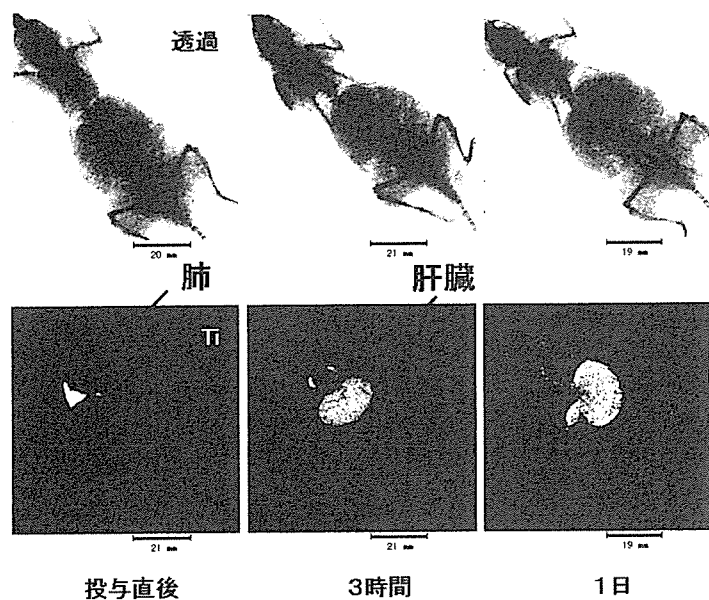


図7 全身動態の経時的変化—XSAMによるTiO<sub>2</sub>投与マウスの透過X線像とTiマッピング像(投与直後、3時間、1日後)

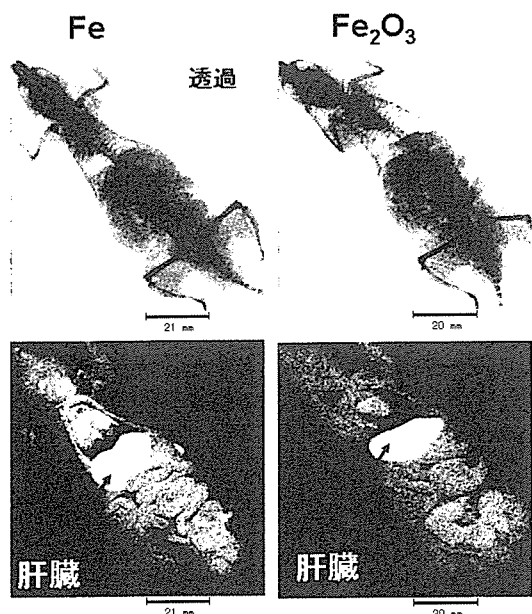


図8 全身動態の微粒子材料依存性(Fe, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)—XSAMの透過X線像とFe元素マッピング像

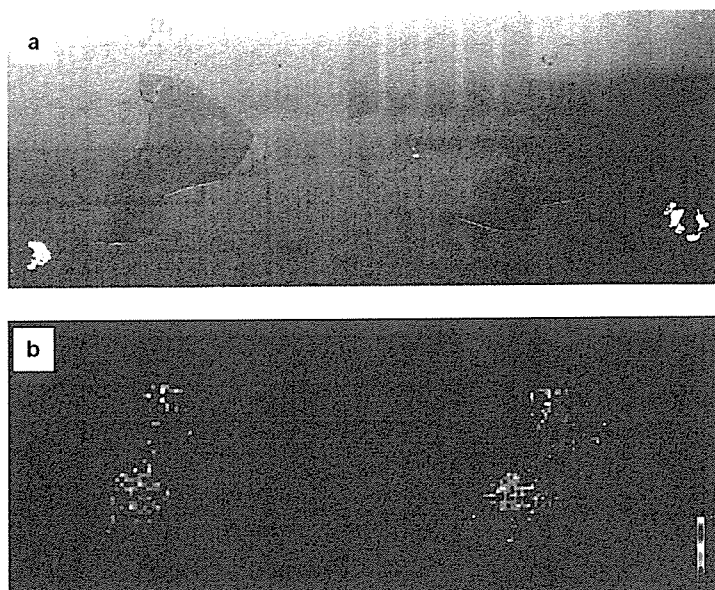


図9 レーザーマッピング法で得られたラット肝臓中(a)のフラーレン分布像(b) (後出 田路・佐藤ら)

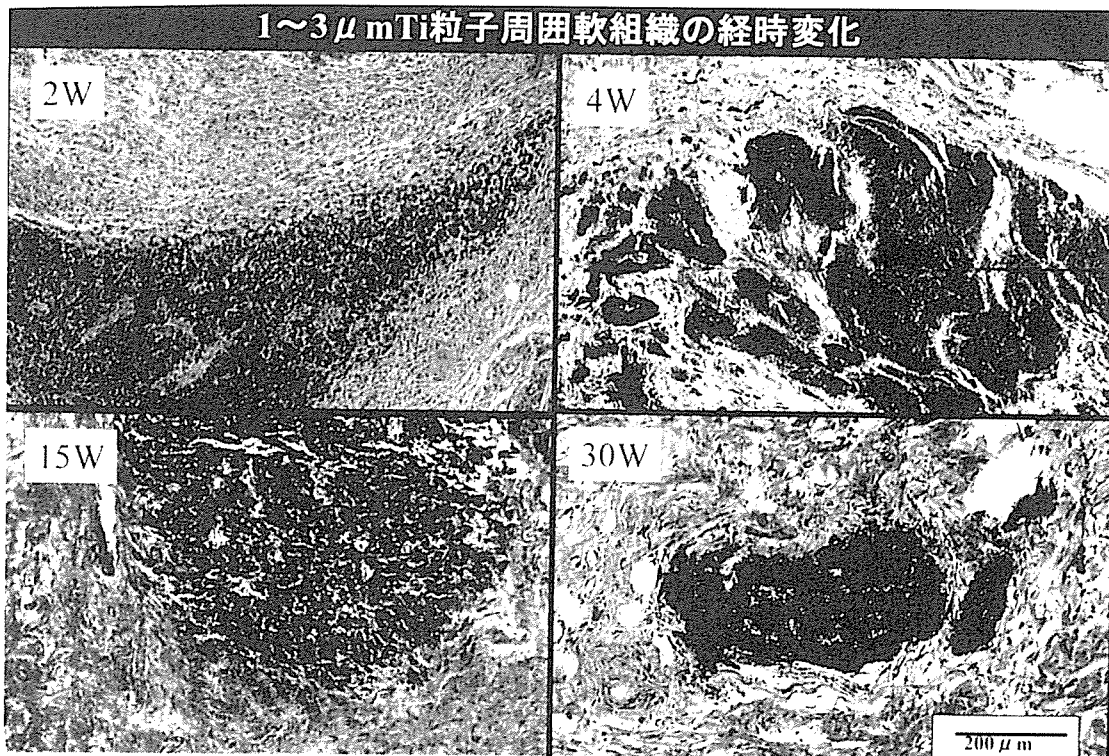


図10 3 $\mu$ m Ti 微粒子を埋入したラット軟組織の経時変化(1, 4, 15, 30 週後)

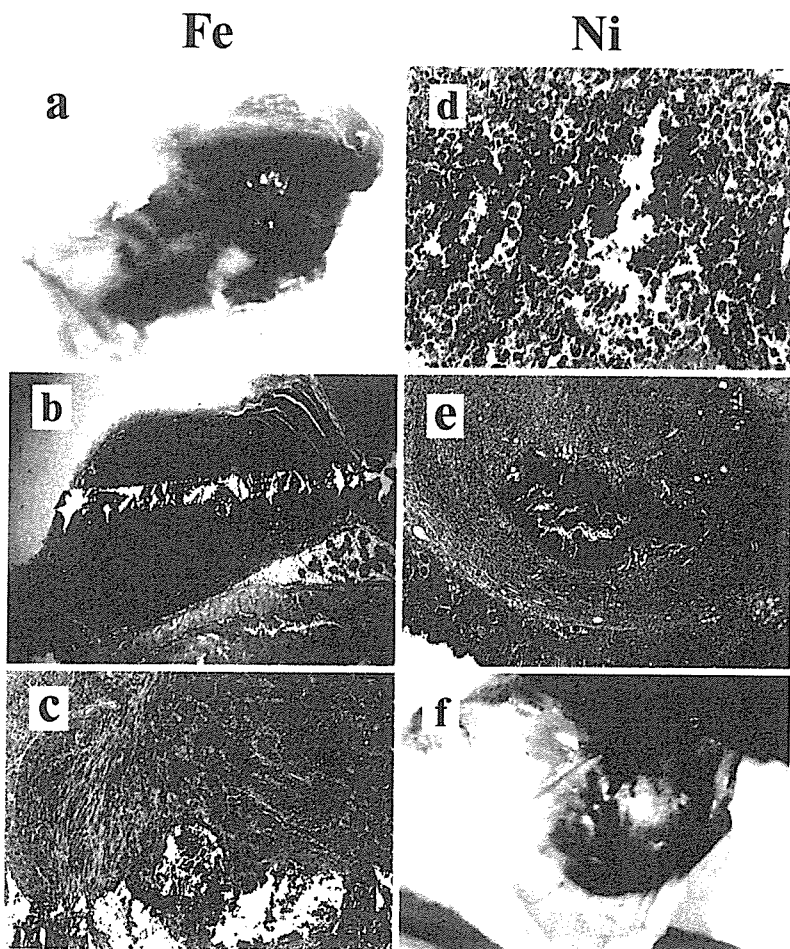


図11 ナノキシコロジー:

a~c: 2 $\mu$ m Fe 微粒子を6ヵ月埋入後のラット軟組織。大量の Fe イオンの溶出・沈着により強い炎症傷害を認める。

d~f: 0.5 $\mu$ m Ni 微粒子を埋入したラット軟組織の経時変化(d:埋入直後-強い炎症、e:1 月後-組織壊死、f:1年後-腫瘍生成)。

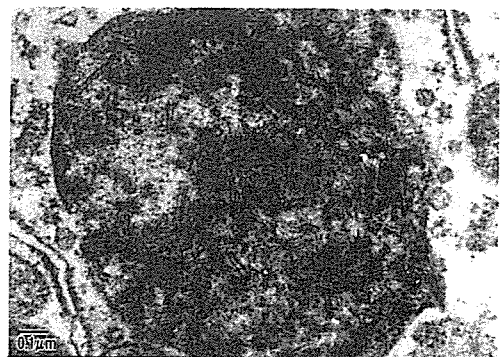


図12 ラット軟組織埋入1週後、細胞のライソソーム中に取込まれた 220nm-CNT

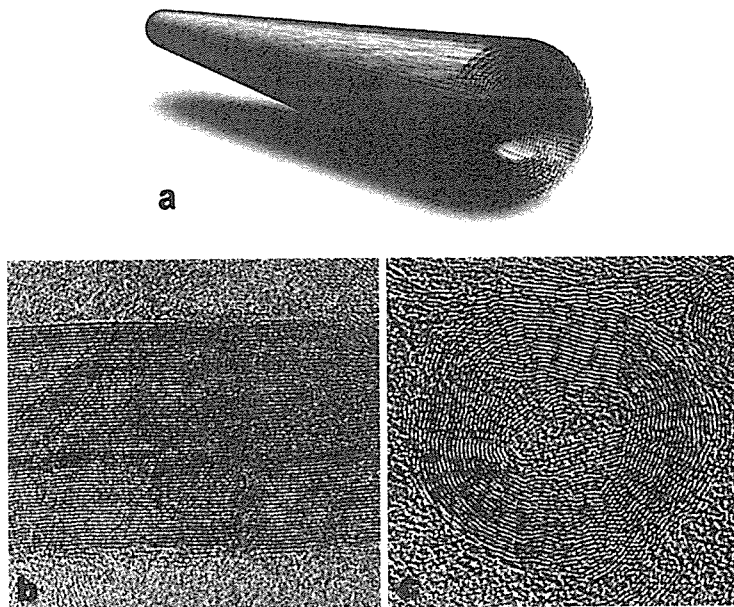


図13 多層 CNT の構造模式  
図(a)、長さ方向平行断面  
(b)および垂直断面(c)の  
超高压電顕による高分解  
能原子像

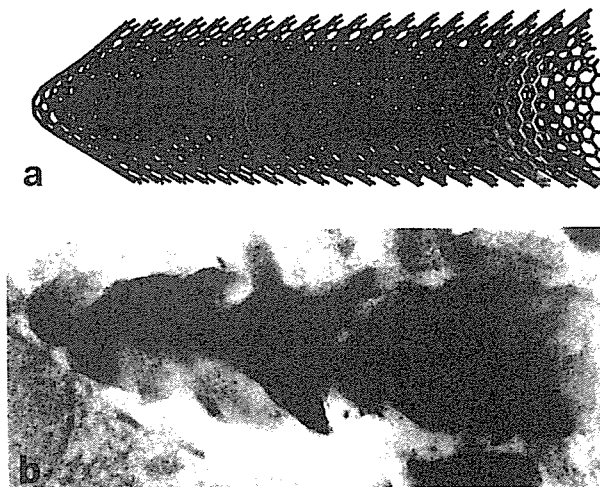


図14 CNF の結晶構造(a)と  
ラット軟組織に1年埋入後、  
細胞内ライソゾーム中に取  
込まれ、破折断片化が進行  
中の 1200nm-CNF (b)  
(100kV 電顕観察)

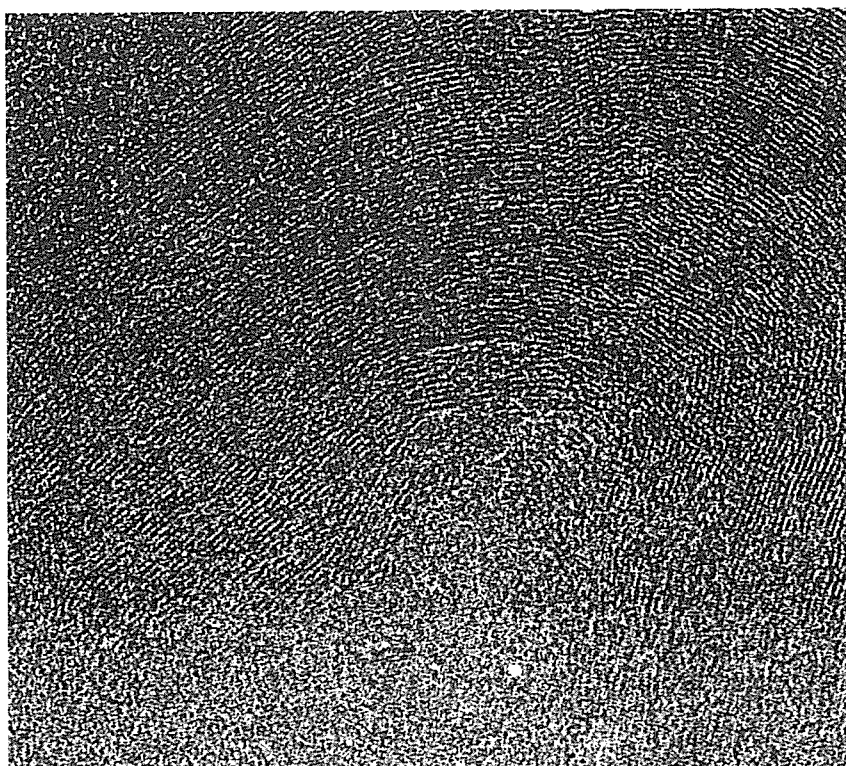


図15 細胞内ライソゾーム中に  
取込まれた 1200nm-CNF の  
超高压電顕による高分解  
能原子像(埋入1年後)。破  
折断片化の進行により結晶  
構造が乱れている。

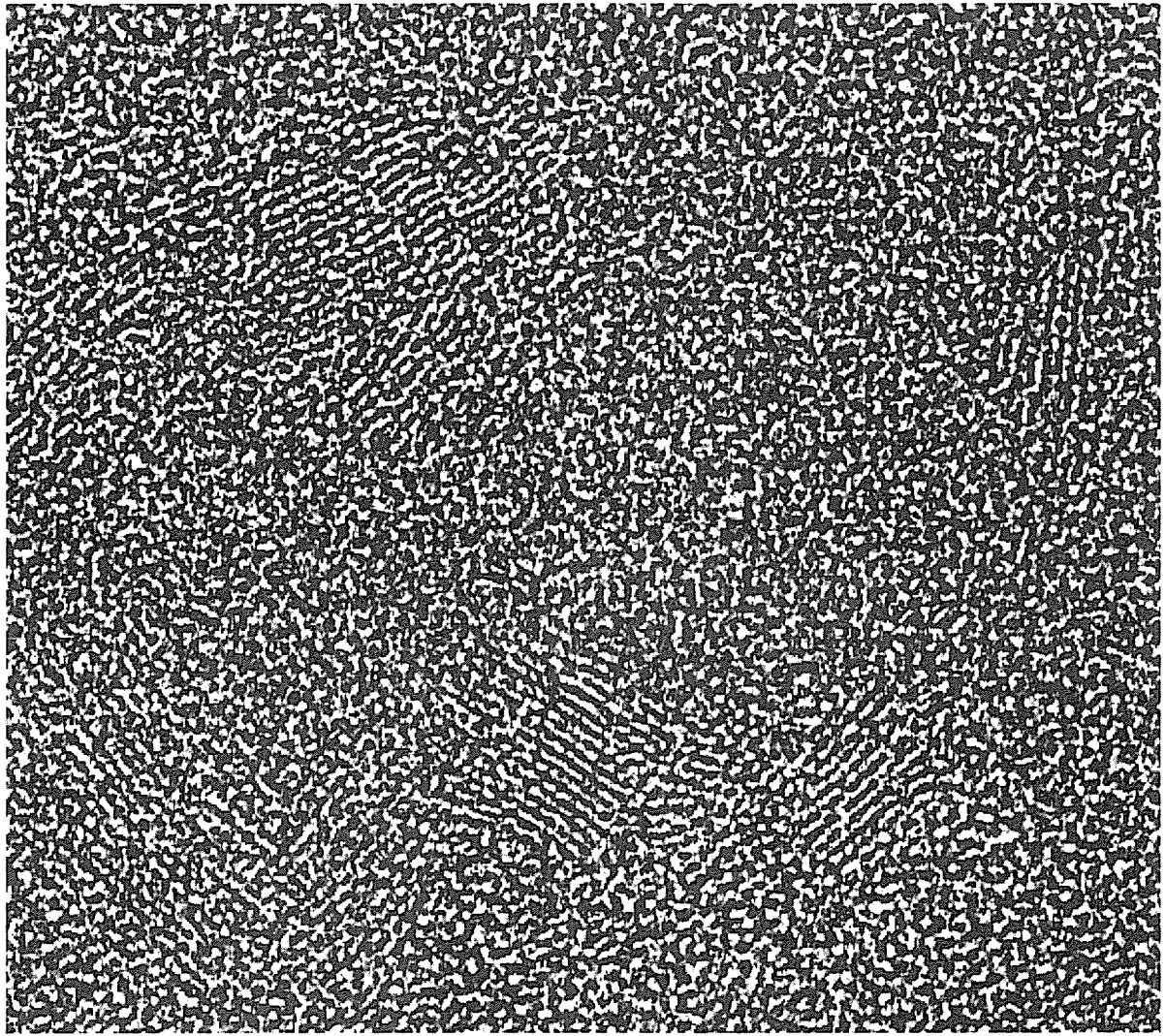


図16 細胞内ライゾゾーム中に取り込まれた1200nm-CNFの超高圧電顕による高分解能原子像(埋入1年後)。破折断片化の進行により、結晶構造が乱れた約15原子層の厚みの結晶破片。

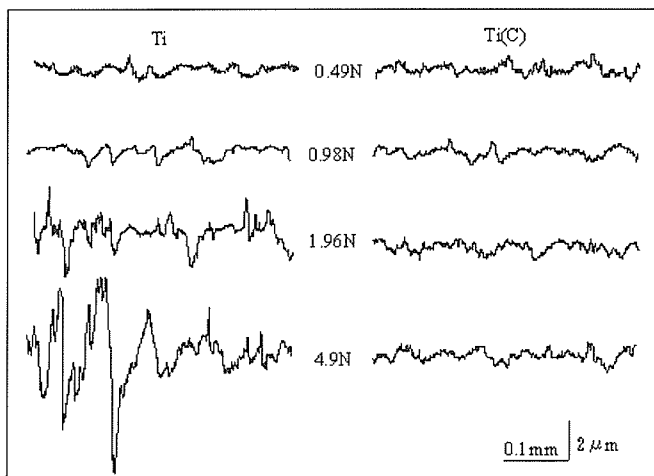


図17 歯科用超音波スケーラー摩耗試験後の断面プロフィール。荷重: 0.49N (50gf)~4.9N (500gf)。Tiに比べ、表面炭化チタン Ti(C)は耐摩耗性にすぐれる。

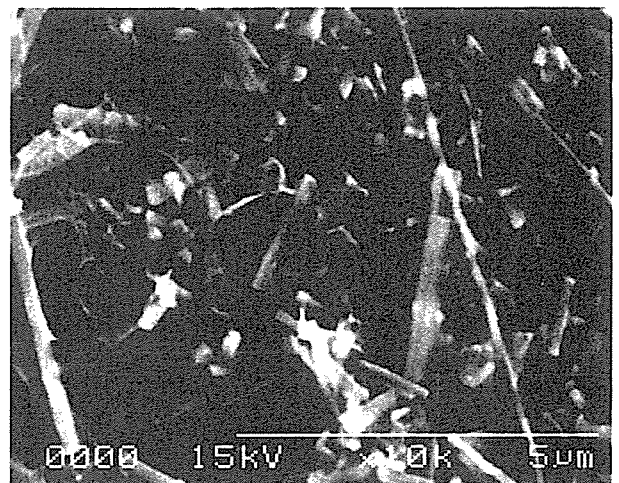


図18 アスベスト(クロシドライト)の分散性とCNTの凝集性

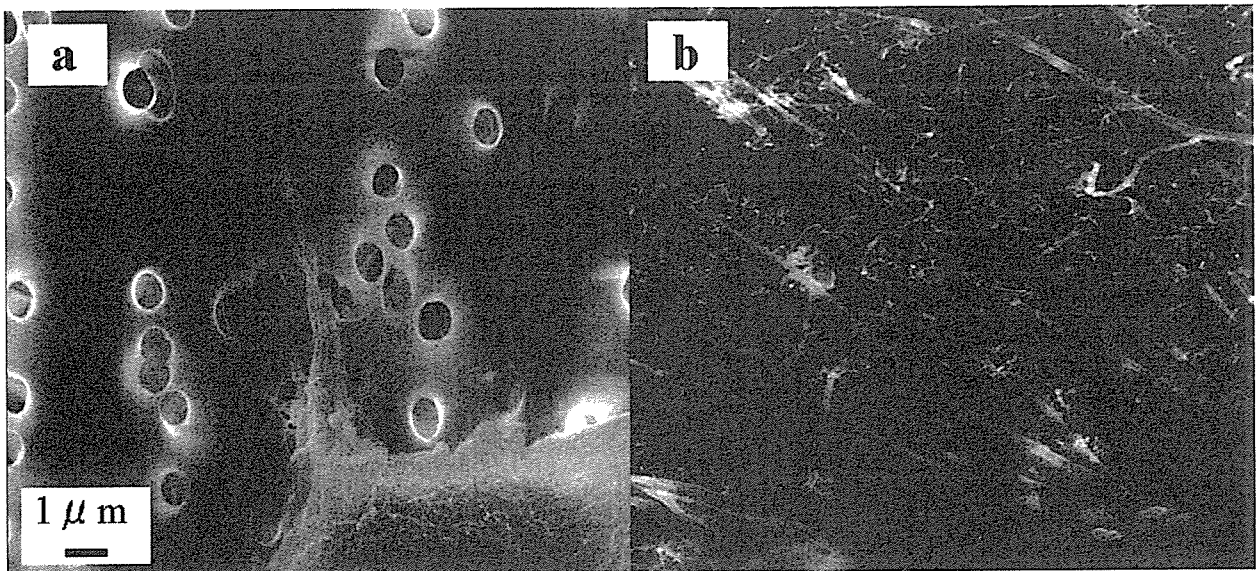


図19 ポリカーボネート膜(a)、CNT(b)上で培養した細胞末端の SEM 像。CNT 上で多数の細胞突起を張り出し強く付着する。

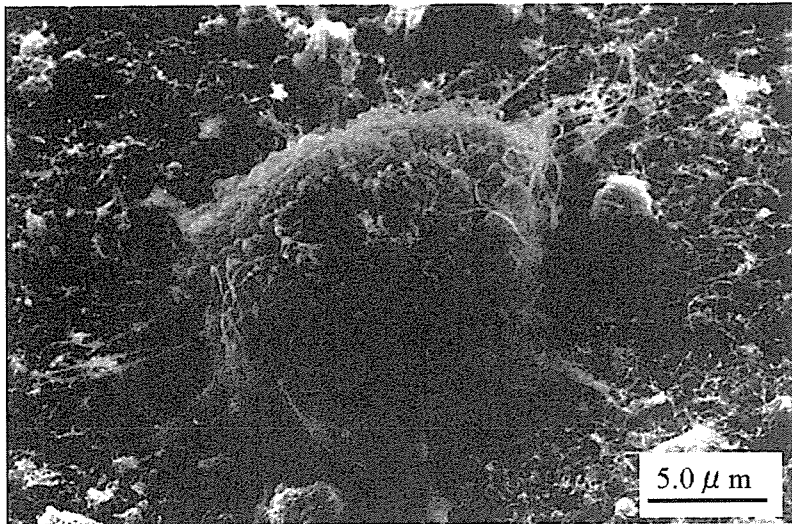


図20 トリプシン処理後の CNT スカフォールド上の培養細胞の SEM 像。細胞末端から張り出した多数の突起が CNT と機械的に結合し、細胞を剥離できない。

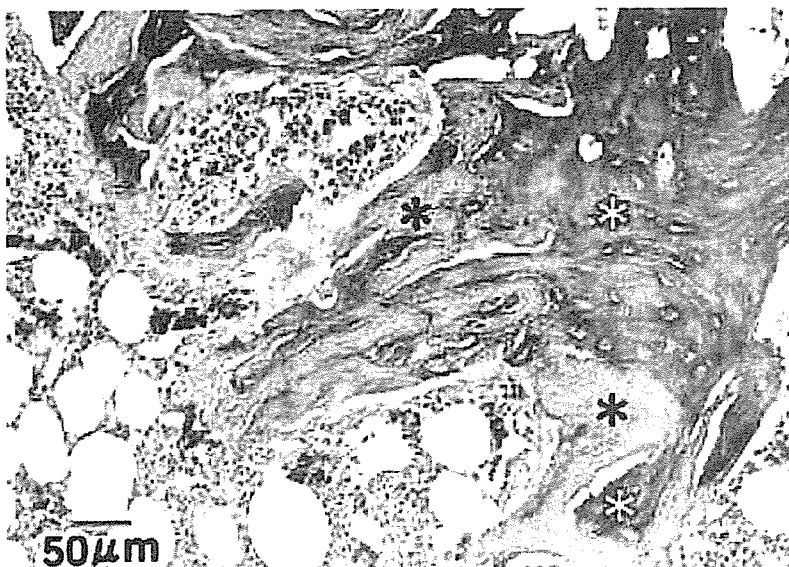


図21 ナノアパタイト-コラーゲンコンポジットの骨置換性。ナノコンポジット部(黒\*)の吸収と新生骨形成(白\*)が不可分に生じ、結果として骨置換性が達成されている。



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	阿部薫明	北海道大学歯学研究科助手
研究協力者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科助教授
研究協力者	赤坂 司	北海道大学歯学研究科助手
研究協力者	久保木芳徳	北海道大学・名誉教授 (株)高研バイオサイエンス研究所

**研究要旨** 一般に生体親和性を持つと言われている材料でも、微小なサイズになるとその生体への影響が変化することが考えられる。数マイクロメートルからナノサイズの微粒子が生体内に取り込まれた際、体内をどのように循環し、特定臓器へと到達・滞留・排出される様子を可視化し、それら臓器に滞留した際の組織への影響（親和性・刺激性）の解明を目的とした。

研究初年度はマウスへの金属微粒子の投与方法として、肺への直接噴霧・尾静脈注射による血流への直接投与、の2種類について検討し、後者において投与後に数週間に渡り経過観察が可能、かつエックス線分析顕微鏡、およびエネルギー分散型蛍光エックス線分析装置による分析を可能とする投与条件を見出した。

また、投与後の経過観察時間に伴う金属微粒子のマウス体内での循環の様子を可視化することに成功した。

#### A. 研究目的

マイクロ・ナノサイズの微粒子が生体内に取り込まれた場合、一般に生体親和性を持つと言われている材料でも細胞に対して刺激性を持つことがある。我々はこれまでに、生体親和性に優れていると言われている生体材料でも、数ミクロンから数百ナノメートルのサイズになると細胞への刺激性を持つものがあることを見出した。一方で、人工関節やインプラントなどの長期使用により磨耗粉(微粒子)が生じ、体内に取り込まれる可能性は否定できない。また、医薬・化粧品や日用品といった分野でもマイクロ・ナノ微粒子が広範囲に使用されてきている。それ故、我々は日常生活の中で知らないうちにマイク

ロ・ナノ微粒子に曝されている可能性がある。

そこで本研究では、生体内に取り込まれた金属微粒子の体内での循環・滞留・排出の挙動を確認することを目的とし、体内動態の可視化を行うための金属微粒子の投与方法、投与量など実験条件の検討を行った。

金属微粒子を投与して実験を行うためには、以下のような諸条件を考慮し、最適条件を模索する必要がある。

〈技術的側面〉

- ・被投与動物の選定
- ・投与方法による相違

- ・投与量の最適化
- ・経過観察時間
- ・分散剤の影響、など

更に投与する微粒子の粒径・形状や金属・化学種の違いが、体内動態へと影響し、また生体組織へと影響することも考えられる。

今回はこれらの条件について、初期検討のための絞込みを計り、投与した微粒子の体内での循環や臓器への蓄積の様子の可視化を試み、蓄積の見られる臓器への影響の確認を目的とする。

## B. 研究方法

### 披験動物

オス 8-12 週齢の ICR 系マウスを用いた。

### 披験物質

投与金属微粒子として、Ti (1-3  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ ), Fe (1-2  $\mu\text{m}$ , 2-3  $\mu\text{m}$ ), Ni (0.8, 3-7  $\mu\text{m}$ ), Pt (1  $\mu\text{m}$ ), TiO<sub>2</sub> (0.02  $\mu\text{m}$ , 0.05  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ ), TiC (0.6-0.9  $\mu\text{m}$ ), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.5  $\mu\text{m}$ ) を用いた (括弧内は製造元データによる平均粒径)。

また分散剤の効果を調べるため、上記微粒子のけん濁液作成の媒体として、生理食塩水のほか、オクチルグルコピラノシド、Tween20 を生理食塩水に加えた溶液も用いた。

金属微粒子の分散液、若しくは乾燥粉末をマウス (ICR 系オス) に投与し、一定期間観察した。投与方法としては、尾静脈注射、及び肺への直接噴霧を行い、一定期間経過を観察した。その後、エーテルを用い、適宜安楽死させて肺・肝臓・脾臓などの臓器の一部を摘出した。各種金属微粒子の臓器への到達・滞留の様子は摘出した臓器から 1 mm 厚の切片を作成し、堀場 XGT-2000 エックス線分析顕微鏡 (XSAM)、および EDAX Genesis エネルギー分散型蛍光エックス線分析装置 (SEM-EDS) により評価した。また開腹したマウスの全身に対しても XSAM による観察を行い、投与した金属微粒子の体内動態の可視化を試みた。

### (倫理面への配慮)

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。

## C. 研究結果

—金属微粒子の投与方法、及び XSAM 観察に適した投与量の検討—

始めに TiO<sub>2</sub> を用い、XSAM での観察に適した投与方法・投与量の模索を行った。気管挿管による肺への直接噴霧 (ミスト・粉体)、尾静脈注射の各方法について、投与量 (TiO<sub>2</sub>) を変化させて、XSAM での観察に適した投与量・濃度などの条件を検討した。ミストでの肺への直接投与を行った場合、総投与量 0.5 mg 以下では摘出臓器及び全身についての蛍光エックス線分析 (XSAM) を行ったが TiO<sub>2</sub> の信号が確認されなかった。投与試料液の濃度・容積の増加が困難であるため、複数回に渡り投与するなど、ミストでの肺への直接投与法は再度検討する必要がある。また、金属微粒子の乾燥粉末を用いた肺への直接投与の場合、5 mg の試料を装置に充填して噴霧した個体から、臓器への到達が観測された。最適な実験条件については現在検討中である。

一方、尾静脈注射の場合も、総投与量 0.2-3 mg の範囲では XSAM での観察には不十分であった。しかし 10 mg/mL のけん濁液を用い、総量で 6 mg 程度投与することにより、XSAM での観察に適した試料が得られた。この結果より、以降の金属微粒子の総投与量を 6 mg (およそ 150-180 mg/kg) に統一し、前述濃度の試料液を 0.3 mL ずつ 2 回に分けて投与を行っている。

### —適切な分散剤の模索—

金属微粒子の分散性の向上を図るため、分散剤についての検討も行った。糖鎖誘導体であるオクチルグルコピラノシド、及び Tween20 を生理食塩水に加えた媒体を用いてけん濁液の作成を行った。1 wt% オクチルグルコピラノシドを分散媒に用いると、分散性の低かった Ti (10  $\mu\text{m}$ ) の分散度は向上し、Ni (0.8, 3-7  $\mu\text{m}$ ) についても分散度は改善された。Tween20 についても、0.5, 1 wt% 濃度のものを分散媒として用いると、オクチルグルコピラノシドと同様の結果が得られた。さらに濃度 5 wt% の溶液を用いてみたが、分散性が階段に向上する様子は見られなかった。そこで 1 wt% オクチルグルコピラノシド、0.5 wt%

Tween20 を分散媒として様々な金属微粒子けん濁液をマウス尾静脈より投与した。オクチルグルコピラノシドを用いた場合、全個体で投与部の変色(黒色)が観察され、一部個体では尾部の壊死も見られた。一方、0.5wt%Tween 溶液を用いた場合、投与部への影響は特に観察されなかった。

#### —各臓器のXSAM 観察結果—

##### 1) 投与微粒子種による各臓器への到達の様子

マウスの尾静脈から総投与量6 mg になるように各種金属微粒子を投与した。1日経過を観察したのち、各個体から肺・肝臓・脾臓・腎臓を摘出してXSAM を用い元素分析を行った。

Ti (10  $\mu\text{m}$ ) を投与した場合、肺への到達が確認された。また肝臓・脾臓へも僅かに到達している様子も検出された。Fe (2-3  $\mu\text{m}$ ) を投与した場合、肺・肝臓・脾臓への到達が確認された。脾臓から非常に強いFeの信号が検出された。Ni (0.8  $\mu\text{m}$ ) を投与した場合、肺・脾臓への到達が確認された。また、肝臓へも僅かに到達している様子も検出された。Pt (1  $\mu\text{m}$ ) を投与した場合、脾臓への特異的な到達・滞留が観測された(図5)。その他の臓器では肝臓への到達が僅かに確認され、肺・腎臓への到達は観測されなかった。

そのほか、金属酸化物( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )の投与も行った。 $\text{TiO}_2$ を投与した場合、肺・肝臓への到達が確認された。また、脾臓へも僅かに到達している様子も検出された。 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ を投与した場合、肺・肝臓・脾臓とも非常に強いFeの信号が確認された。

これらの結果は表1に示した。なお現在のところ、投与した金属微粒子の腎臓への到達は確認されていない。

##### 2) 経過観察時間による到達・滞留の様子

総投与量が6 mg になるようにマウス尾静脈より $\text{TiO}_2$  (0.02  $\mu\text{m}$ ) を投与したところ、投与後3時間で $\text{TiO}_2$ の肺・肝臓への到達が観測された(図6)。その相対濃度は肺が肝臓の10倍程度であった。1日経過を観察した個体では、肺に滞留している $\text{TiO}_2$ の濃度が減少し、肺・肝臓への滞留金属の濃度差は数倍程度になった。また、 $\text{TiO}_2$ の脾臓への到達も確認された。1週・4週経過を観察した場合は、肺からのTiの信号は殆ど観察されず、肝臓・脾臓からのTiの信

号が殆どであった。これらの結果を経過観察時間に対してプロットしたものが図7である。ここから、 $\text{TiO}_2$ は投与直後から肺に到達し、十数時間で排泄されていく。一方、投与後、肝臓へは数時間、脾臓へは数十時間かけて $\text{TiO}_2$ が到達していくという体内での金属微粒子の循環の様子が観測された。

#### —SEM-EDSによる観察結果—

XSAMによる観察を行った試料のうち、強い蛍光エックス線信号が検出された試料について、SEM-EDSを用いて強拡大像の観察を行った。肺では、観察されるSEM像や生体組織をなぞって見える炭素Cのマッピング増とは明らかに異なる、あるパターンに沿って投与した元素(Ti)が分布している様子が観測された(図8d)。また、脾臓では、投与した元素(Ti, Fe)に対応する数ミクロン程度の大きさのスポットが観測された(図8f)。一方、肝臓では上述のような金属元素の局在した様子は観測されず、組織に一様に分布していた。

#### —体内動態の可視化—

次に、 $\text{TiO}_2$ を投与したマウスの全身像の観察を行い、 $\text{TiO}_2$ の体内動態の可視化を試みた。前項で金属微粒子を投与し、各種臓器の一部を摘出した後のマウス(図3a, 9a)を観察対象として用いた。投与後数分では $\text{TiO}_2$ は肺のみから観測された(図9b)。一方、3時間経過すると、肺のみならず、肝臓からも投与微粒子の信号が観測されている(図9c)。その後、経過観察の時間が長くなると、肺からの信号が弱くなり、4週経過すると、ほぼ肝臓のみが観測されるようになる(図9f)。このほか、Ti, Fe, TiC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ を投与した場合も同様に、体内動態のイメージングに成功した(図10)。

## D. 考察

金属微粒子の分散性の改善を図り、2種類の界面活性剤の使用を試みた。オクチルグルコピラノシド、Tween20ともに分散性改善の効果は見られたが、前者を用いた場合、投与部(マウス尾部)の変色が全個体において観察された。媒体のみを投与した場合でも軽度ではあるが同様の症状が見られるため、投与部に見られた変色は、オクチルグルコピラノシド

に起因していると考えられる。また媒体のみ投与した場合、症状が軽減しているため、けん濁させた金属微粒子との相乗効果の存在も考えられる。生体へと投与するのに適切な分散剤の選択、分散剤を用いた際の体内動態への影響について、今度も検討を行っていく。

今回の実験では、元素分析の結果をエックス線源の Rh の強度を用いて規格化を行っているが、生体由来で一定量存在すると考えられる別な元素（例えば硫黄 S など）による規格化を行い、双方の比較をする必要があるかも知れない。また元素分析スペクトルの強度を比較するには各臓器の体積の影響を考慮する必要がある。各臓器に滞留している元素の質量、若しくは単位体積当たりの元素量の算出が出来れば、詳細な比較が可能となる。

現在のところ、短期間の経過観察の結果しか得られていないが、投与微粒子種の違いにより到達する臓器に違いが見られている。今後、長期間の観察を行い、その違いを明らかにする必要がある。

現状では投与金属微粒子の腎臓への到達・滞留が観察されていない。体内の老廃物を排出する機能を持つ腎臓で、血中の微粒子が尿として排泄されているのか、それとも再度血流に乗り体内を循環しているのかは、現在のところ不明である。排泄物を回収・分析することにより何らかの知見を得ることが出来ると考えられる。濾過により物質交換を行う臓器であることから、元来、物質が蓄積しにくい構造を持ち合わせているのかも知れない。また、肺へと到達した微粒子も比較的短時間のうちに排出されている様子が観察されているが、ここでも同様の機構が働いているのかも知れない。

肺の SEM-EDS 測定の際に観察された Ti の分布パターンは、臓器内の組織（肺胞・血管など）に沿って微粒子が滞留しているものと考えている。今後、組織切片との比較・観察を行う予定である。

## E. 結論

今回検討した投与方法・投与量を持ちいる事により、各種金属微粒子を投与した後、数週間の経過観察が可能、且つ、XSAM、SEM-EDS での観察に十分な投与量を見出すことに成功した。また、投与した金属微粒子が体内を循環していく様子を、像期間

の比較および全身像として可視化することに成功した。

## F. 研究発表

### 学会発表

1) ○阿部薫明、森山英樹、新倉謙一、Fei Feng、門出健次、西村紳一郎：任意の糖鎖を導入可能な糖鎖捕捉フラーレンの設計：第 2 回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会（札幌、2006 年 6 月 22 日～23 日）、同講演予稿集、p. 16、2006

2) ○阿部薫明、森山英樹、新倉謙一、Fei Feng、門出健次、西村紳一郎、亘理文夫：バイオ応用を目指した糖鎖結合フラーレンの作製：平成 18 年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏期セミナー（盛岡、2006 年 7 月 22 日）、同講演予稿集、p. 11、2006

3) ○阿部薫明、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫：バイオ応用へ向けた機能性フラーレンの作製：平成 18 年度秋期第 48 回日本歯科理工学会学術講演会（名古屋、2006 年 7 月 22 日～日）、歯科材料・器械、25 (5)、p. 360、2006

4) ○阿部薫明、森山英樹、新倉謙一、Fei Feng、門出健次、西村紳一郎、亘理文夫：任意の糖鎖を導入可能なフラーレン誘導体の設計 —バイオ応用を目指して—：第 28 回日本バイオマテリアル学会（東京、2006 年 11 月 27 日～28 日）、同講演予稿集、p. 282、2006

5) ○阿部薫明、小山千佳、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、亘理文夫：生体に投与した金属ナノ微粒子の体内動態の観察：第 3 回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会（仙台、2006 年 12 月 11 日～12 日）、同講演予稿集、p. 21、2006

6) ○阿部薫明、小山千佳、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、亘理文夫：金属微粒子の体内動態の可視化と生体組織への影響：第 19 回代用臓器・再生医学研究会（札幌、2007 年 2 月 2 日）、同講演予稿集、p. 8、2007

7) ○阿部薫明、小山千佳、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、亘理文夫：蛍光エックス線顕微鏡を用いたナノマテリアルの体内動態の可視化：2007年三学協会北海道支部研究発表会（札幌、2007年2月6日～7日）、同講演予稿集、p. 4、2007

#### G. 知的所有権の取得状況

無し

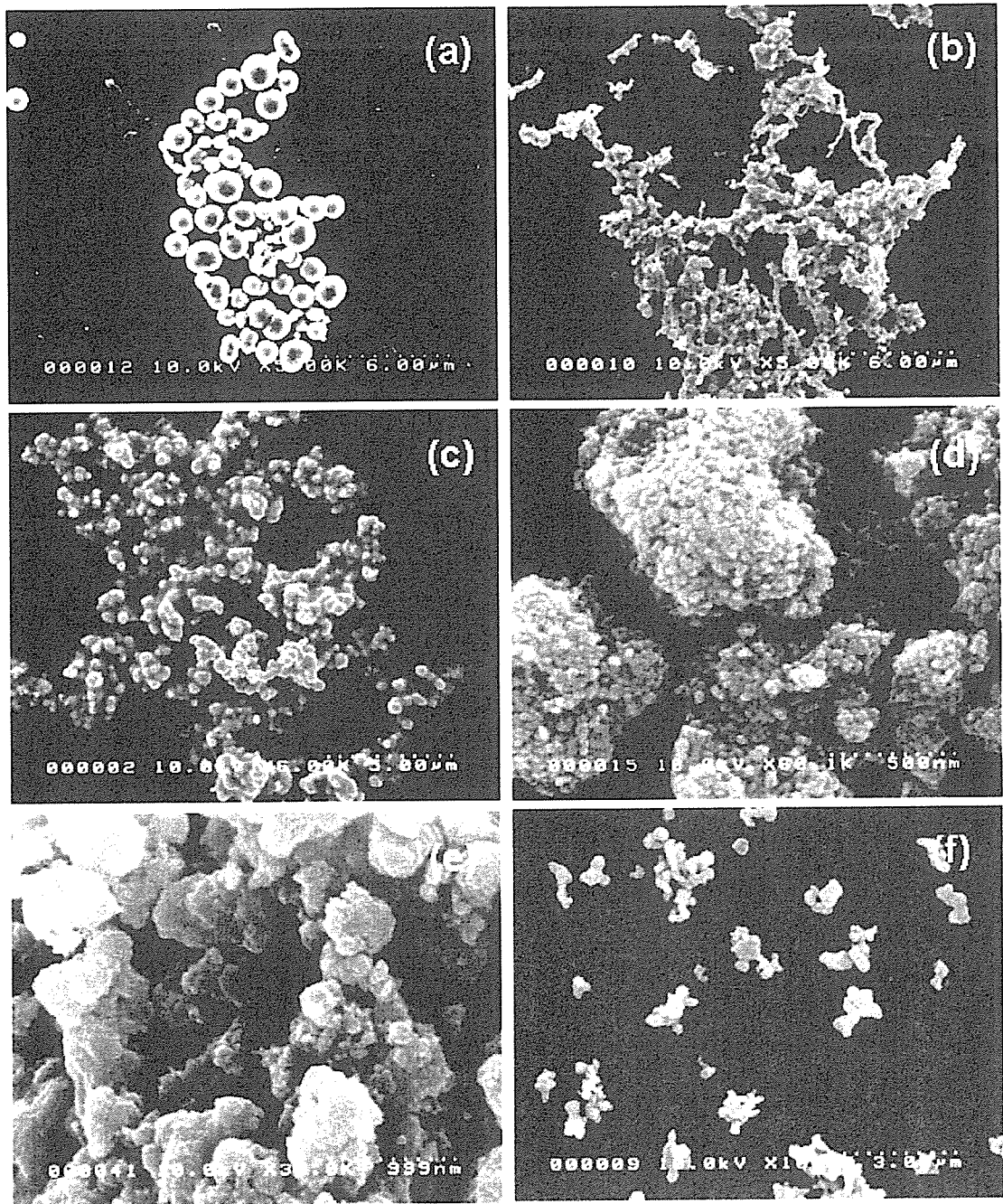


図1 用いた金属微粒子のSEM像 (a : Fe (1-2  $\mu\text{m}$ )、b : Ni (0.8  $\mu\text{m}$ )、c : Pt (1  $\mu\text{m}$ )、  
d : TiO<sub>2</sub> (0.02  $\mu\text{m}$ )、e : Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.5  $\mu\text{m}$ )、f : TiC (0.6-0.9  $\mu\text{m}$ )、括弧内：平均粒径（製造元データ）



図2 金属微粒子の投与方法（左：気管挿管、右：尾静脈注射）

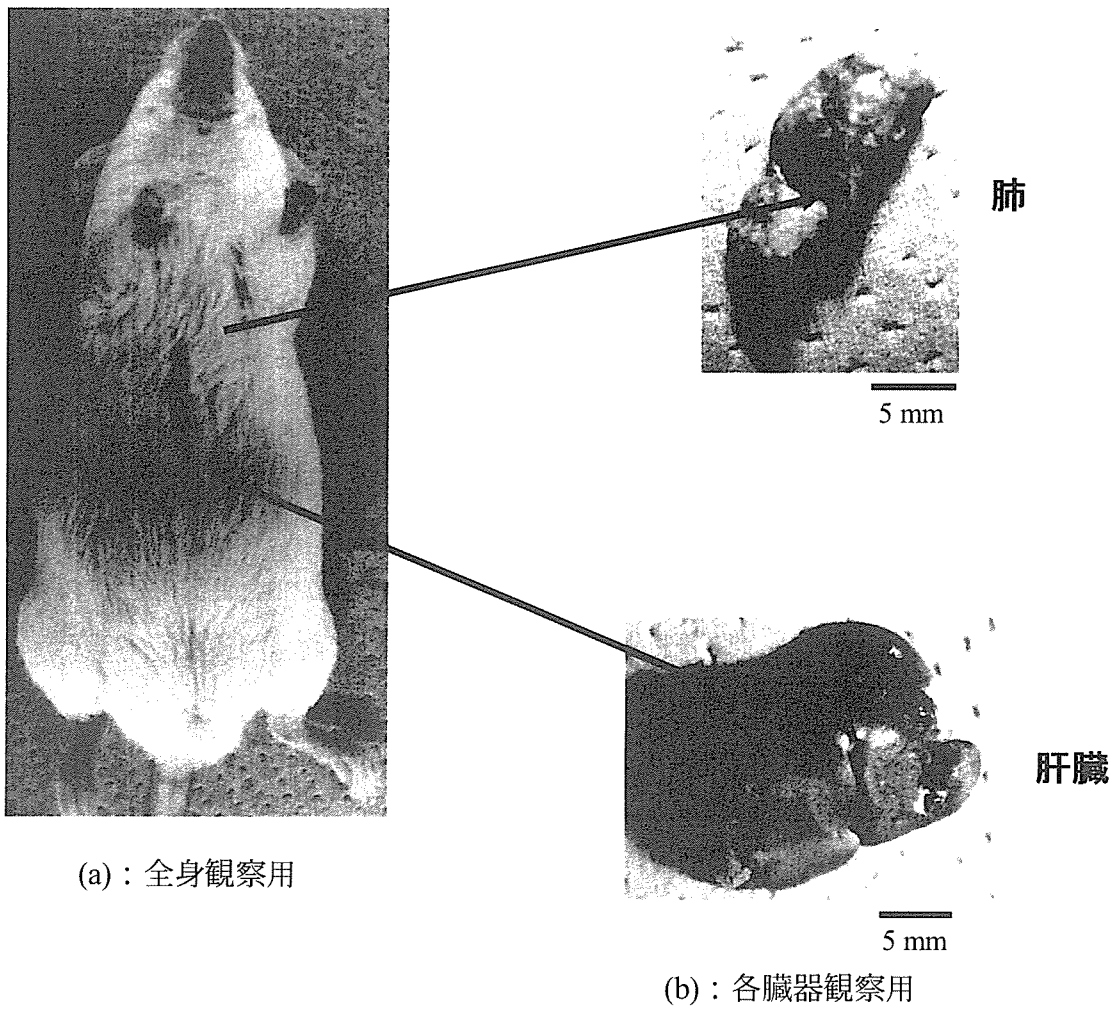
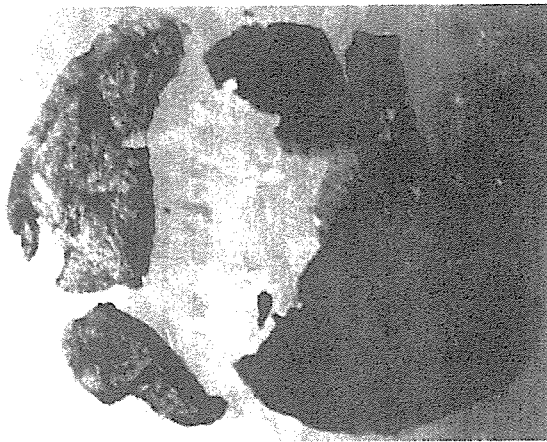
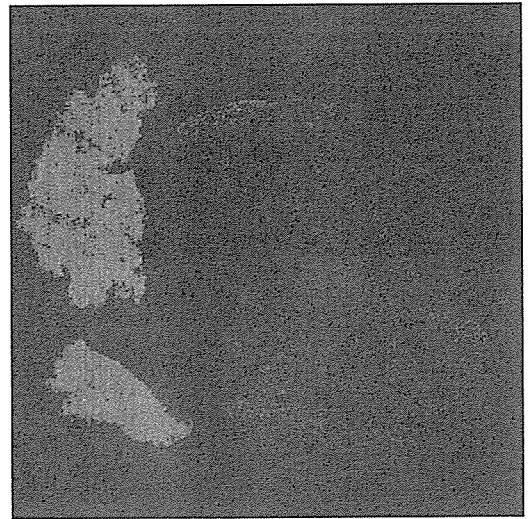


図3 測定用試料

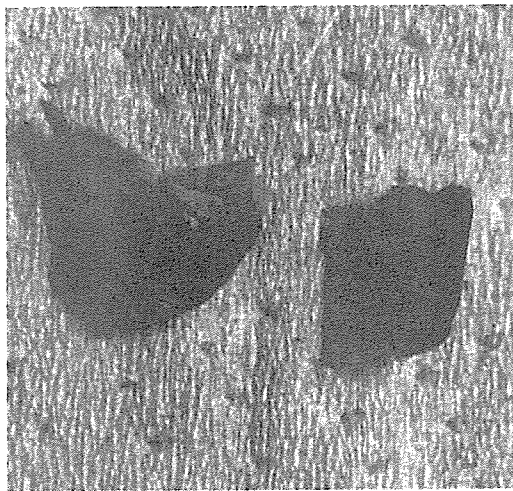


肺

肝臓

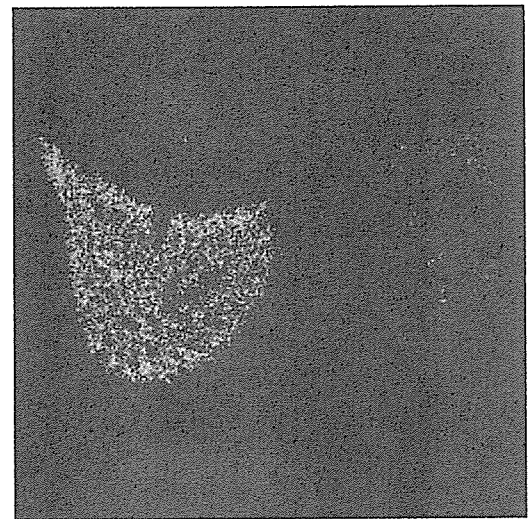


4.5 mm



肝臓

脾臓



4.4 mm

図4 TiO<sub>2</sub> 投与3時間後の摘出臓器のXSAM 観察像 (左: 実写、右: 蛍光エックス線マッピング)



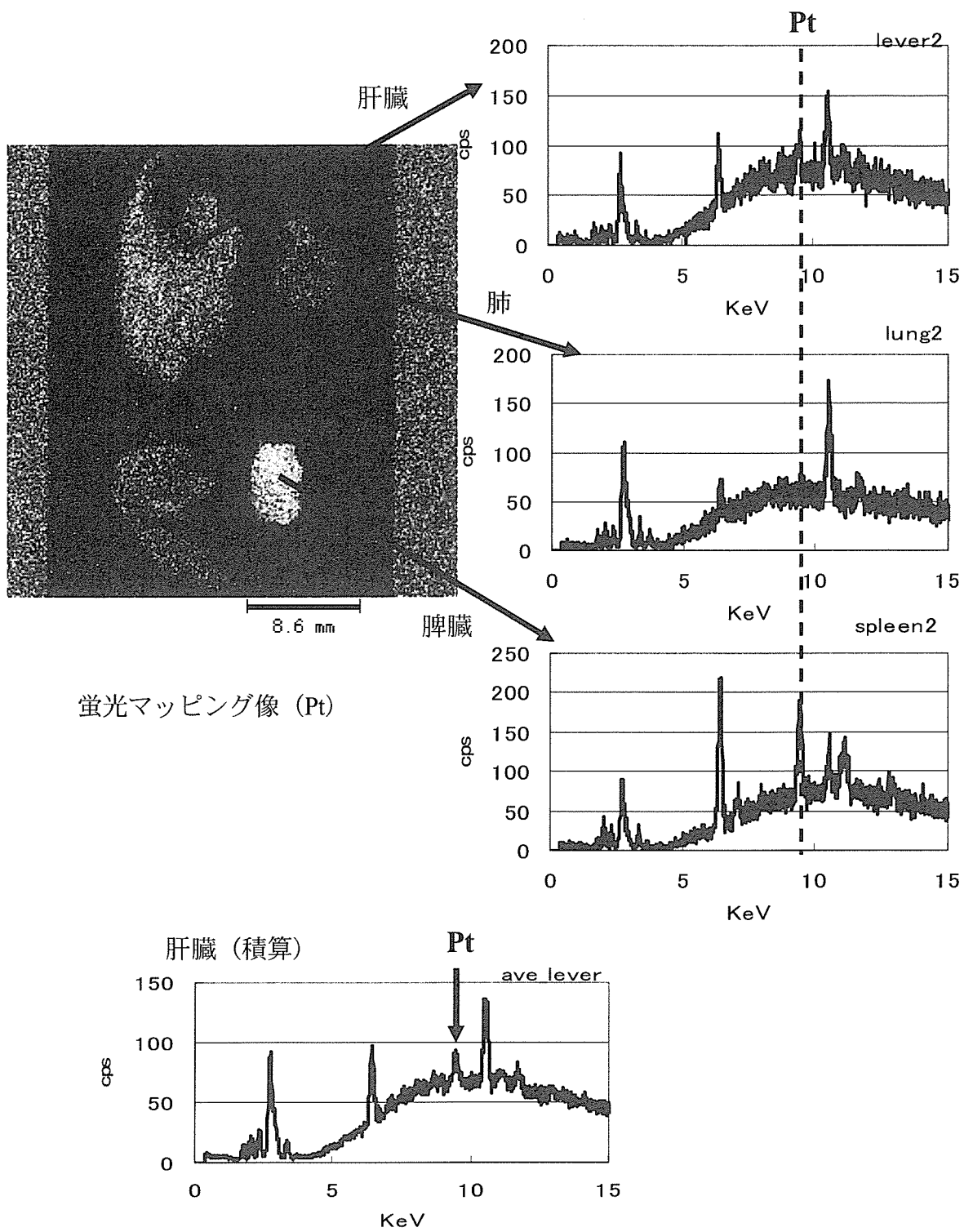


図5 抽出臓器の蛍光マッピング像・元素分析スペクトル (Pt 投与後1日)

経過時間		肺	肝臓	脾臓	腎臓
直後	TiO <sub>2</sub>	++	-	-	-
3時間	TiO <sub>2</sub>	++	+	w	-
1日	Ti <sub>s</sub>	+	w	w	-
	Fe <sub>s</sub>	++	+	++	-
	Ni <sub>s</sub>	+	w	+	-
	Pt <sub>s</sub>	-	w	+	-
	TiO <sub>2</sub>	+	+	w	-
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	++	++	+	-
1週	Fe <sub>s</sub>	+	+	++	-
	TiO <sub>2</sub>	w	+	+	-
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+	++	++	-
2週	TiC <sub>s</sub>	w	+		
4週	TiO <sub>2</sub>	-	+	+	-

表1 投与した金属微粒子の経過時間・臓器間の比較

観察時間

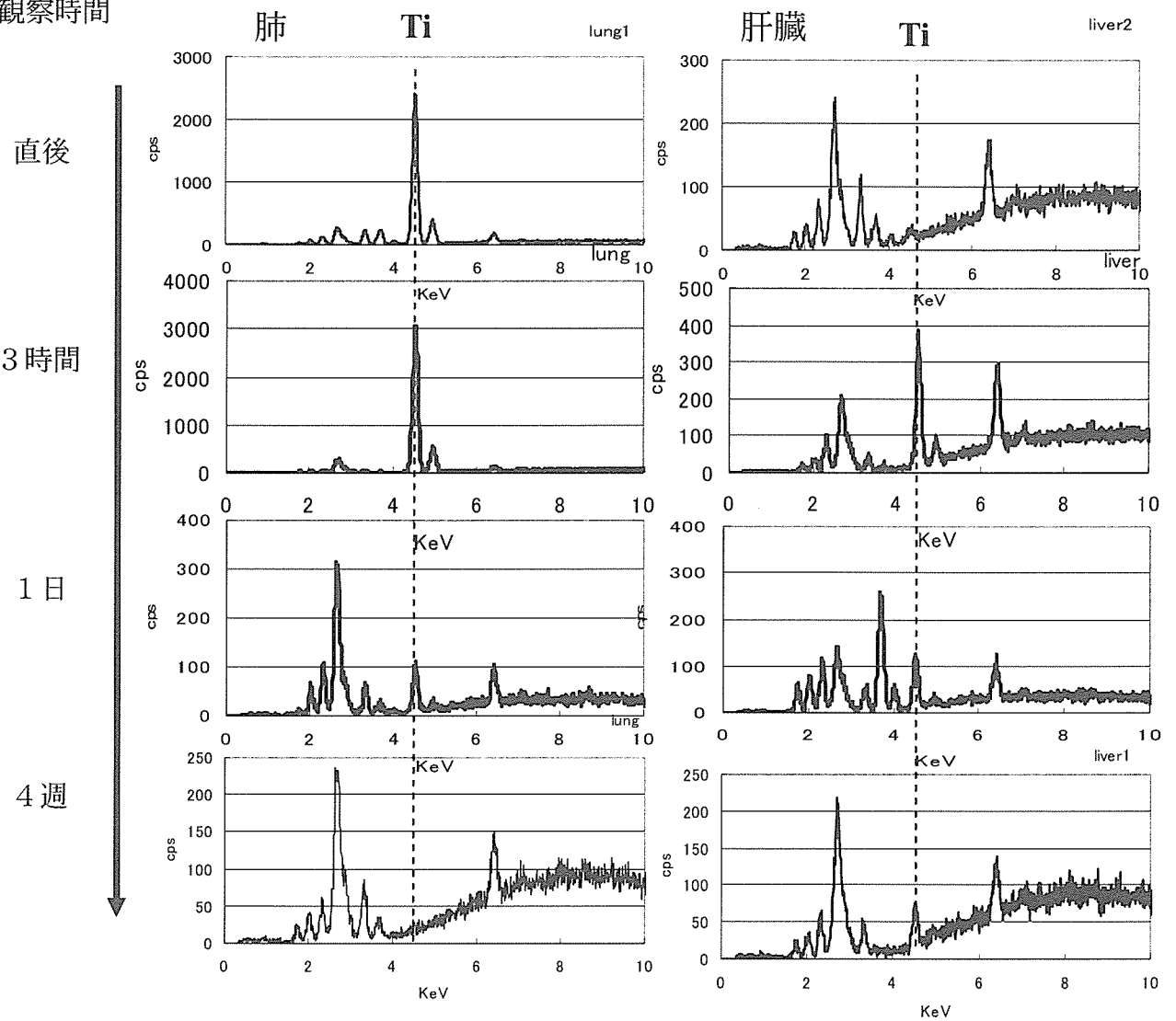


図6 元素分析スペクトルの経過時間による変化 (TiO<sub>2</sub> 投与後)

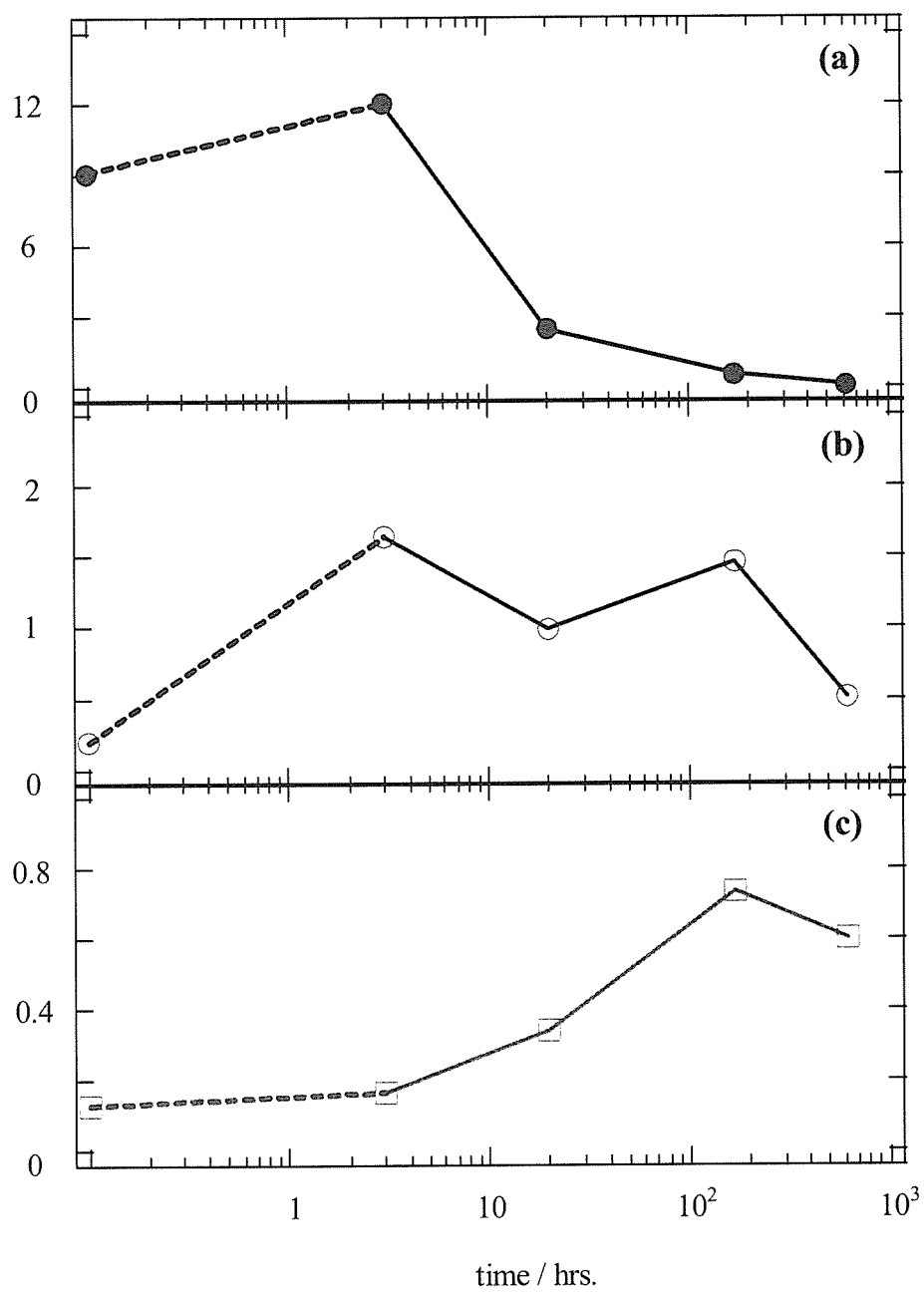


図7  $\text{TiO}_2$ の体内循環の様子 (a: 肺、b: 肝臓、c: 脾臓)