

図8 抽出臓器のSEM - EDS 観察像 (a-d: 肺 (Ti 投与)、a: SEM 像、b: 元素分析スペクトル、c: EDS マッピング (C)、d: EDS マッピング (Ti)、e,f: 脾臓 (Fe 投与)、e: SEM 像、f: EDS マッピング (Fe))

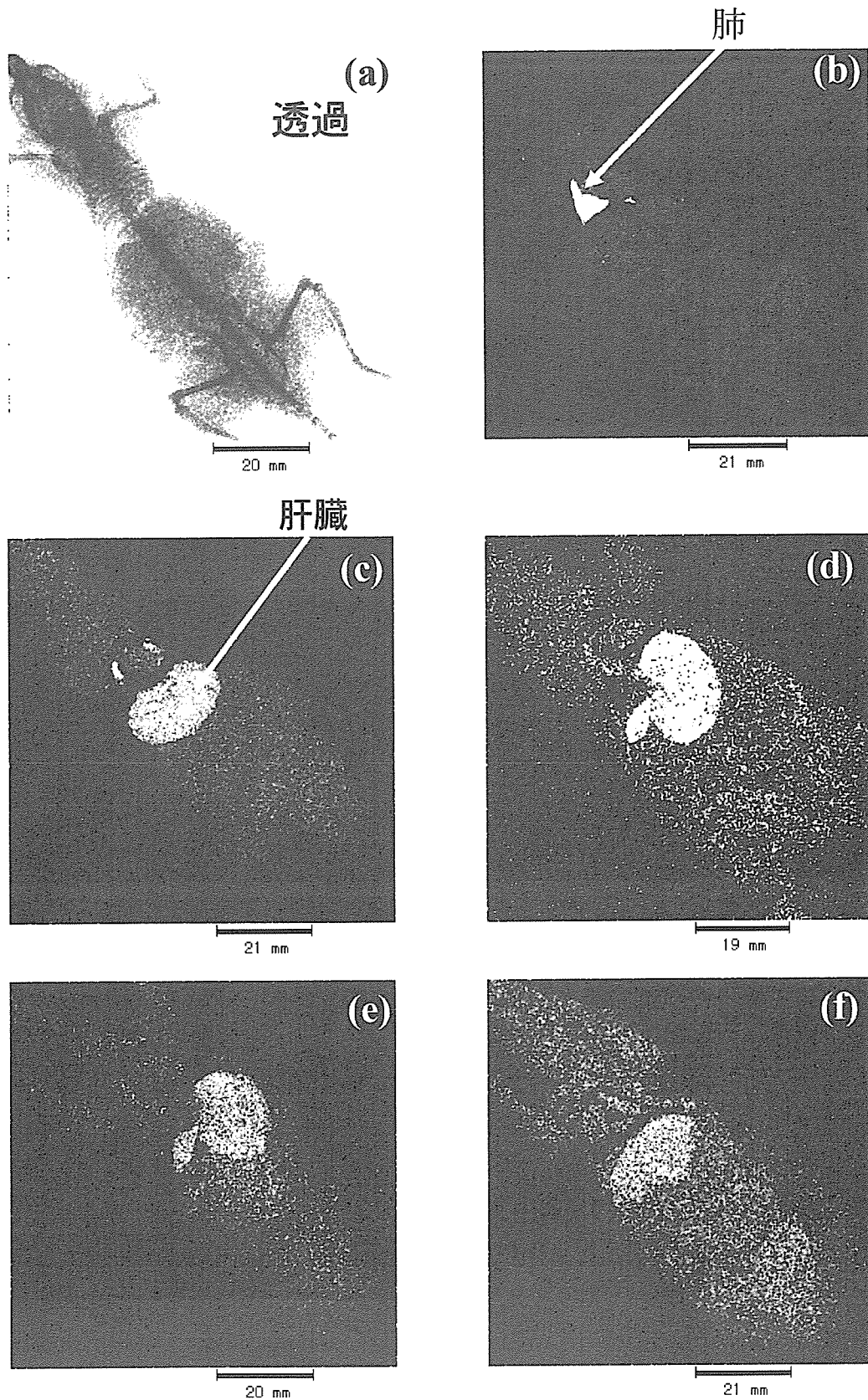


図9 金属微粒子( $\text{TiO}_2$ )投与マウスの全身のXSAM観察像 (a: 透過エックス線像、 b: 投与直後、 c: 投与3時間後、 d: 投与1日後、 e: 投与1週間後、 f: 投与4週間後)

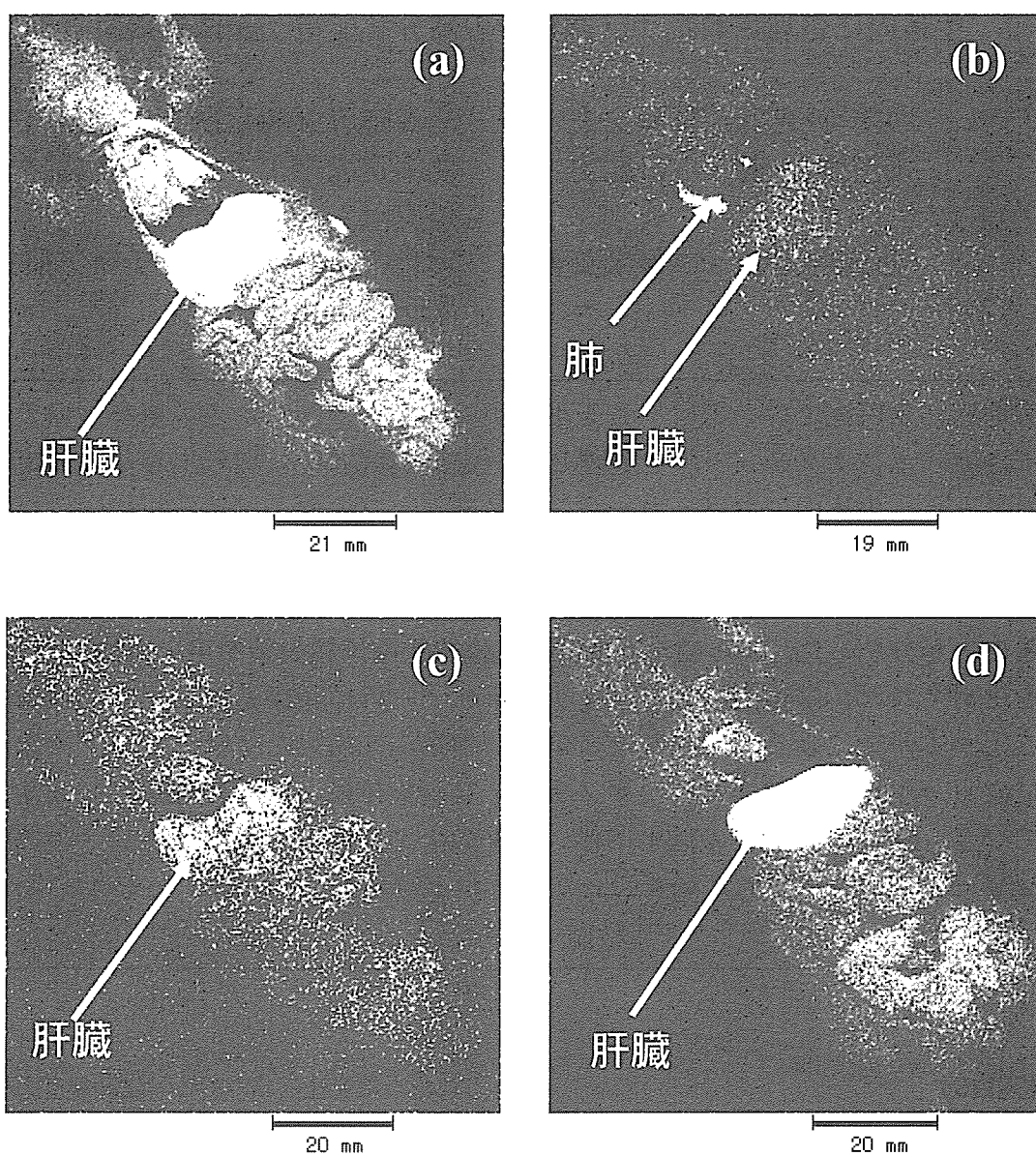


図10 金属微粒子投与マウスの全身のXSAM観察像 (a : Fe, b : Ti, c : TiC, d :  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  )

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

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	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
研究協力者	市野瀬英喜	理化学研究所フロンティア研究システム 副ディレクター

**研究要旨** 本研究においては、カーボンナノチューブのバイオ応用を見据え、ラット皮下にカーボンナノチューブを包埋し、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、生体内におけるカーボンナノチューブ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、生体組織とカーボンナノチューブ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、生体内に存在するナノチューブ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、本手法を用いたナノチューブ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、時間の経過と共に凝集がほどこけていき、さらに結晶性の低下に伴い個々のナノチューブは分断され、最終的にはライゾームに取り込まれていくことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

近年の急速なナノテクノロジーの進展は新たなリスクを生み出している。ナノマテリアルによって生じる環境や健康への影響は既に現実的な問題になっているにもかかわらず、その潜在的なリスクについてさえ十分に議論されているとは言い難い。最近顕になってきたアスベストによる中皮種の問題は、それ自体大問題であると同時に、今後あり得るべき事態を暗示しているかにさえ思える。一方で、ナノテクノロジーを駆使したナノマテリアルやそれらを応用したナノエレクトロデバイスの開発は今後の日本国の浮沈を懸けて取り組むべき最重要課題であることは疑う余地も無く、世界をリードするための開発競争は熾烈を極めつつある。そのような理由から、ナノマテリアルが使用された製品が市販されるよう

になった現在においても、健康へのリスクについては十分に把握できていないのが現状である。

他方、ドラッグデリバリーシステム (DDS: Drug Delivery System) をはじめとするバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合は、すでにそれなりの期間研究が継続されているものの、なかなか明らかな見通しが立ちかねる状態にあるように見える。また、たとえばナノパーティクルの中には、既に製品化され使用されているものがある一方、その応用にあって安全性については手が回りかねているのが実状である。無論、バイオナノテクノロジーを駆使した研究開発を増進させることと、安全性や健康へのリスクマネージメントを両立させることが必要であることは言うまでも無いが、従来二つの作業が同時進行したことは、事実上余り多くない。このこと

は、二つの作業が全く別個の技術基盤の上に成り立っていたからと考えられる。ナノマテリアルテクノロジーの分野では、原子構造、電子構造、物性、を一体のものとして捉えることによって、二つの作業のいわば一体化に関する試みが既に行われつつあるが、バイオナノテクノロジーにおいても、対象を限定すればおそらくこのことは可能である。特に、生体とバイオマテリアルとが近接ないしは接触した状態を生体とバイオマテリアル間の異相界面問題としてとらえれば、界面における原子構造、電子構造、物性、の三者相関の問題に還元することが出来るはずである。原子構造・電子構造・物性相関については、生体のみでは原子配置の複雑さといったありようがマテリアル系とはかなりかけ離れている。純粋な生体系に比べれば、上述の界面問題に系を帰着させれば、前途はかなりの見通しがきくことになる。このような手法を生かせば、①ナノマテリアルの生体反応性に関する学術的・科学的データの整備、ナノテクノロジーのメリットとデメリットの両面からの総合的把握検討、②生体/ナノマテリアル界面に於ける物質移動と反応性の評価並びに安全性基準の提起、③これに立脚したナノバイオマテリアルの開発、などは十分に守備範囲となる。

そこで本研究では、カーボンナノチューブなどのナノパーティクルに興味の対象を絞り込み、生体とナノマテリアル反応の機構の共通項目と個別項目とに分けて原子・電子論的に解明し、ナノマテリアルのバイオ医用応用に求められる一定の指針得ることが最終的な目的である。その初期段階として、生体内におけるカーボンナノチューブ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。

## B. 研究方法

ラット皮下にナノ微粒子(カーボンナノチューブ、カーボンナノファイバー)を包埋し、一定期間経過後に生体組織片を取り出した(還流固定、オスミウム・酢酸鉛二重染色)。生体組織片を脱水、浸透後にエポキシ樹脂へ包埋・重合した後、ミクロトームにより厚さ80nm以下に薄片化することでTEM観察用試料を作製した。生体組織片の高分解能観察に先立ち、低加速電子顕微鏡(日立H-700、加速電圧75kV)

を用いて細胞内におけるナノ微粒子の凝集形態をTEM観察した。その後、超高压超高分解能電子顕微鏡(日本電子JEM-ARM-1300、加速電圧1250kV、点分解能0.12nm)を用いて、生体組織片内に包埋されたナノ微粒子の高分解能TEM観察を行った。尚、TEM観察は室温にて行い、記録には通常のTEM用フィルムを用いた。

## C. 研究結果

生体組織片試料の観察に先立ち、超高压電子顕微鏡を用いたナノ微粒子高分解能TEM観察の優位性を明らかにするため、エポキシ樹脂に包埋されたカーボンナノチューブの観察を行った。試料は、エポキシ樹脂にカーボンナノチューブを混合・重合したものを、ミクロトームにより80nm程度の厚みに切り出して作製した。図1に観察結果を示す。図1-1の全体像から、樹脂に包埋されたカーボンナノチューブが明瞭なコントラストで観察されていることは明らかである。さらに図1-2、図1-3には、ナノチューブを断面方向、動径方向から見た高分解能TEM像をそれぞれ示した。どちらの場合も、カーボンナノチューブの層状構造が明瞭に観察されていることが分かる。一方、包埋に使用したエポキシ樹脂は、非晶質特有の粒状コントラストとして観察されているが、デフォーカス条件を適切に設定することにより、樹脂による像質の劣化を極力低減可能であることが分かった。これは、加速電圧の増加に伴い分解能が向上すること、さらに電子線の透過能が増大することに起因しており、超高压電子顕微鏡は生体組織内におけるナノ微粒子の高分解能TEM観察に優れた性能を発揮しうることを意味している。他方、電子線透過能の増大は、生体組織観察におけるコントラストの低下を引き起こすことになる。そこで本研究では、ナノチューブの分散状況などの微細組織観察には低加速透過型電子顕微鏡を用い、生体内ナノチューブの高分解能TEM観察には超高压電子顕微鏡を利用することにより、ミクロンオーダーからナノオーダーまでを網羅した組織学的検討を試みた。

カーボンナノチューブをラット皮下に包埋し、一週間経過後に取り出した生体組織片の低加速電顕、超高压電顕による観察結果を図2-1および図2-2に

それぞれ示した。低加速電顕では、生体細胞組織が明瞭に観察され、また包埋されたカーボンナノチューブは凝集体として存在していることが分かる。一方、超高圧電顕による観察からは、カーボンナノチューブ凝集体は明瞭なコントラストで示されてはいるが、生体組織によるコントラストは不鮮明になっている。先に述べたとおり、生体組織とナノチューブ分散状況の把握には低加速電顕による観察が有用であることが分かる。図3には、低加速電顕観察より得られたカーボンナノチューブ凝集体の拡大像を示した。包埋されたナノチューブはほとんどが絡み合った状態であるが、図中央部には、一部ほどけたナノチューブも観察されている。また、ほとんどのナノチューブは湾曲しているが、折れ曲がったり、分断したようなものは見られなかった。図4には、同組織片を超高圧電顕により微細組織観察(図4-1)ならびに高分解能 TEM 観察(図4-2、図4-3)をまとめて示した。微細組織観察からは、先ほどと同様にカーボンナノチューブの凝集が確認される。さらに、高分解能 TEM 観察結果を見れば、カーボンナノチューブの層状構造に対応した格子縞が明瞭に観察されている。これは、カーボンナノチューブが生体内においても安定に存在し、原子レベルでの構造変化や結晶性の劣化が生じていないことを意味している。

次に、カーボンナノチューブをラット皮下に包埋し、一年間経過後に取り出した生体組織片についても同様の観察を行った。図5は低加速電顕にて観察されたカーボンナノチューブ凝集体の微細組織写真である。一週間包埋試料と比較して、カーボンナノチューブのコントラストは若干弱くなっており、また、一部分断したようなナノチューブが多数観察された。さらに、ナノチューブの一部がライソゾームに取り込まれている様子も見られていることより、ナノチューブ凝集体の分離が生じていることが予期される。図6には、同組織片を超高圧電顕により微細組織観察(図6-1)ならびに高分解能 TEM 観察(図6-2、図6-3)をまとめて示した。組織観察写真、ならびに高分解能 TEM 写真双方から、カーボンナノチューブの層状構造は保たれていることが分かるが、一方で、図6-3からは層状構造に対応した格子縞がやや不明瞭になっていることも見受けられる。これは、ナノチューブの原子構造に若干の乱れが生じて

いることに起因すると思われる。

#### D. 考察

ラット皮下に包埋したカーボンナノチューブを TEM 観察した結果、一週間包埋後と一年間包埋後のナノチューブの分散状況、ならびに原子構造には若干の違いが見られた。図7には、それぞれの生体組織片を低加速電顕で観察した結果を並べて示した。一週間包埋後組織片からは、包埋したナノチューブはほとんど分離することなく凝集体として存在し、また、ナノチューブの屈曲や分断は見られない。一方、一年間包埋後の試料においては、明らかにナノチューブ凝集体のサイズは小さく、また、一部がライソゾームに取り込まれていることが分かった。これは、時間の経過と共に、ナノチューブの凝集がほどこけていくと共に、ライソゾームに飽食されていくことによる。さらに、個々のナノチューブに着目すれば、ナノチューブの平均長は明らかに減少しており、分断したと思われるものも多数観察された。これより、生体環境においては、カーボンナノチューブは時間と共に強度の低下、言い換えれば結晶性の劣化を生ずることが予想される。図8には、それぞれの生体組織内におけるカーボンナノチューブの高分解能 TEM 像を並べて示した。一週間包埋試料では、カーボンナノチューブの層状構造に対応した格子縞が明瞭なコントラストとして観察されている。一方、一年間包埋試料については、層状コントラストは若干不明瞭であり、また、層状コントラストが消失する部位が漸続的に存在している様子も観察された。層状コントラストの消失は、ナノチューブ層上における炭素原子の結合の乱れ(配位数欠陥や不對結合手)が存在することに対応すると考えられる。即ち、生体組織内においては、ナノチューブの化学結合は必ずしも安定ではなく、時間の経過と共に構造が劣化していくことが本研究より明らかとなった。

#### E. 結論

本研究においては、カーボンナノチューブのバイオ応用を見据え、ラット皮下にカーボンナノチューブを包埋し、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、生体内におけるカーボンナノチ

ューブ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、生体組織とカーボンナノチューブ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、超高圧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、生体内に存在するナノチューブ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、本手法を用いたナノチューブ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、時間の経過と共に凝集がほどけていき、さらに結晶性の低下に伴い個々のナノチューブは分断され、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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Bingshe Xu, Junjie Guo, Xiaomin Wang, Xuguang Liu, Hideki Ichinose “Synthesis of carbon nanocapsules containing Fe, Ni or Co by arc discharge in aqueous solution” Carbon, 44, 2631 (2006)
2. Xiaomin Wang, Bingshe Xu, Xuguang Liu, Junjie Guo, Hideki Ichinose “Synthesis of Fe-included onion-like Fullerenes by chemical vapor deposition” Diamond & Related Materials, 15, 147 (2006)
3. X.M. Wang, B.S. Xu, X.G. Liu, H. Ichinose “Analysis of ultrastructures in Fe-encapsulating onion-like fullerenes” Journal of Electron Microscopy, 55, 13 (2006)

### 2. 学会発表

1. H.Ichinose, M.Kozuka, T.Hirose, I.Ume-eda and N.Sakaguchi “Laser Assisted Sample finish” Proceedings of 16th International Microscopy Congress, P1079, Sapporo 2006
2. N.Sakaguchi, R.Kokado, A.Ochiai, K.Yonezuka and H.Ichinose “HRTEM and ab-initio calculation analysis of metallic ion implanted silicon grain boundaries” Proceedings of 16th International Microscopy Congress, P1431, Sapporo 2006
3. 坂口紀史, 巨理文夫, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 市野瀬英喜 “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”, 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」研究会講演要旨集, P24, 宮城県, 仙台市 2006

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
無し。
2. 実用新案取得  
無し。

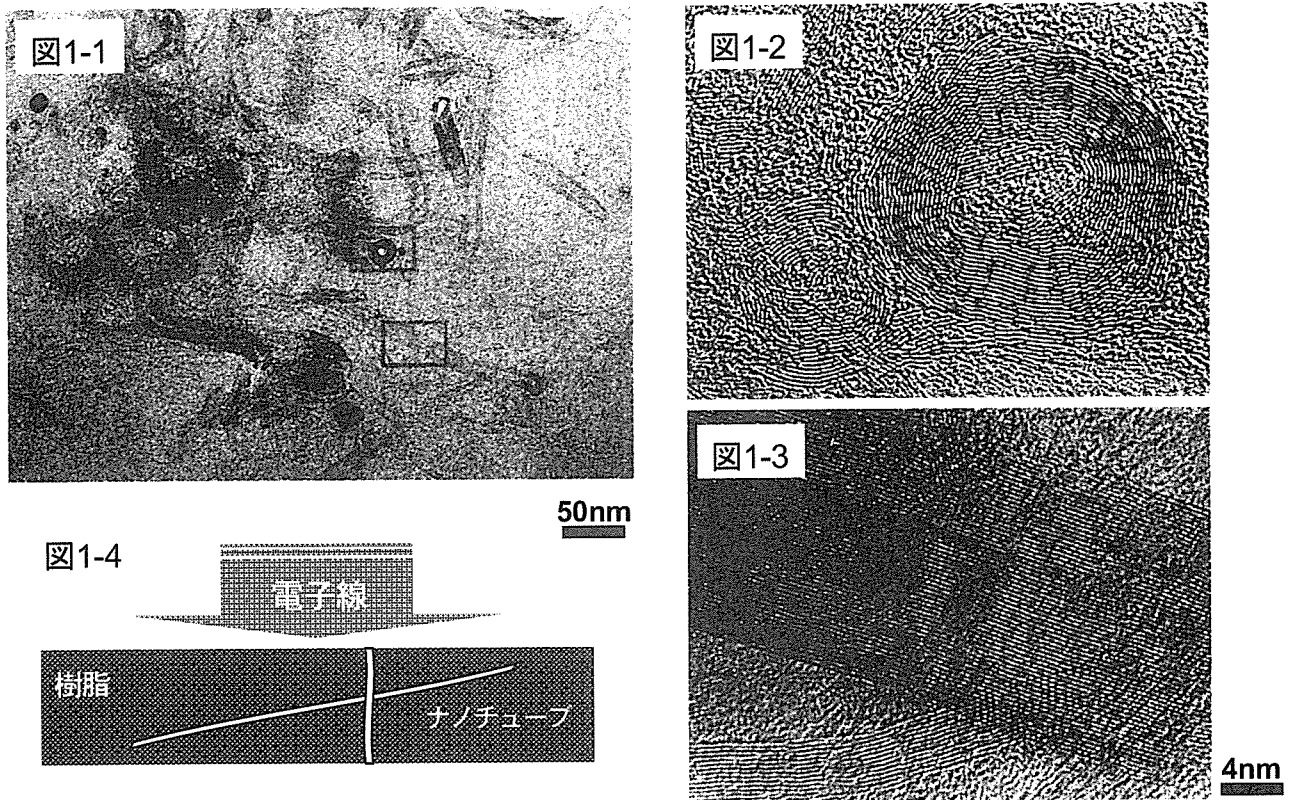


図1 エポキシ樹脂に包埋したカーボンナノチューブの超高圧電子顕微鏡による観察例。  
 (1-1：明視野像、1-2、1-3：高分解能 TEM 像、1-4：試料と観察方向を表す模式図)

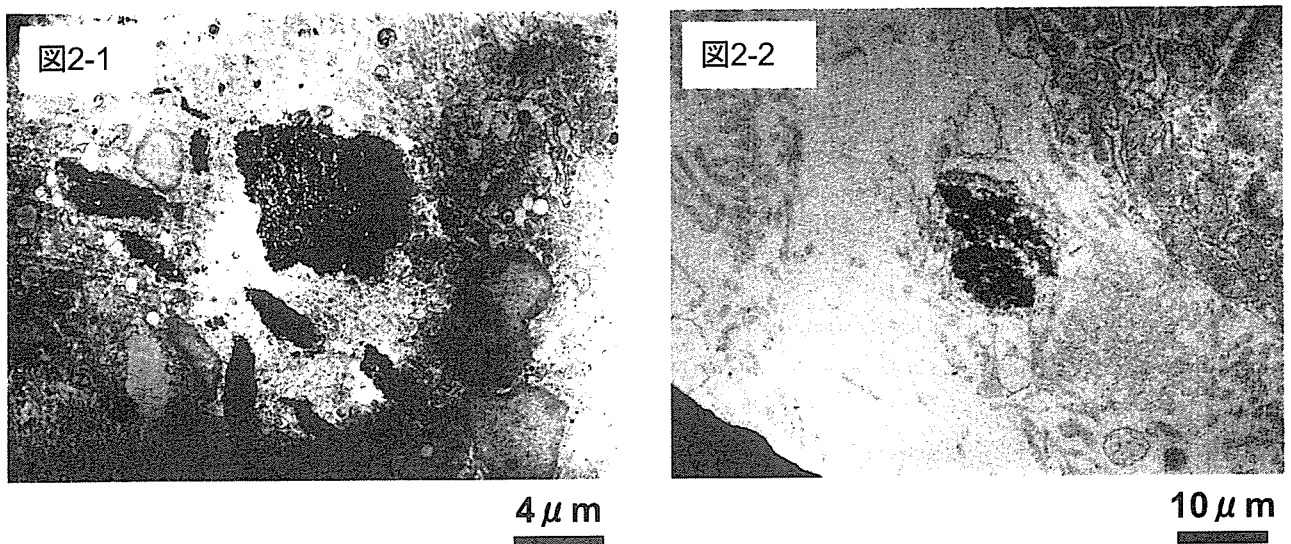


図2 ラット皮下にナノチューブ包埋一週間経過後の生体組織片における微細組織観察結果。  
 (2-1：低加速電顕による観察、2-2：超高圧電顕による観察)





200nm

図3 ナノチューブ包埋一週間経過後のナノチューブ分散状況（低加速電顕）。

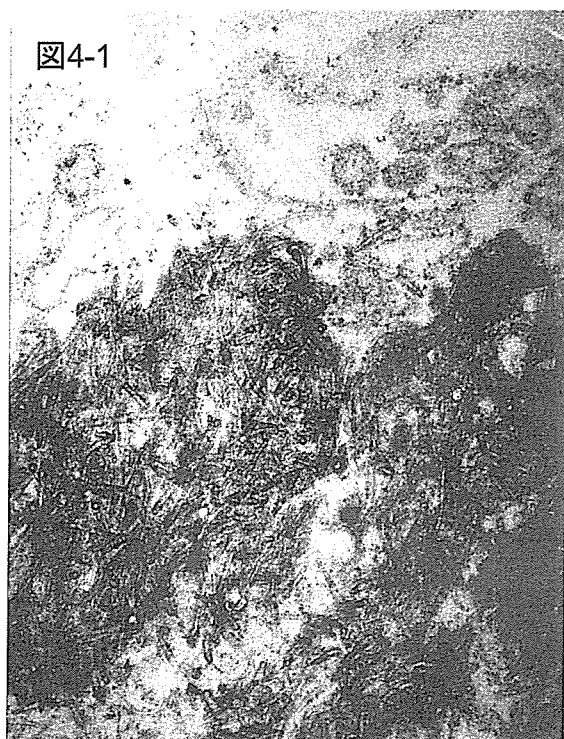


図4-1

100nm

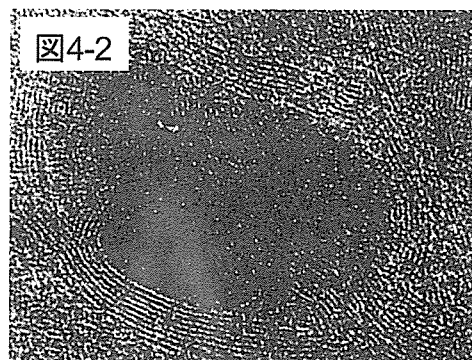


図4-2

4nm

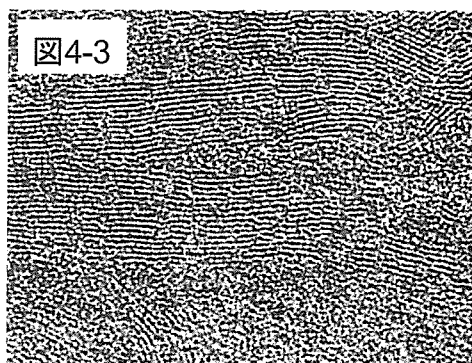


図4-3

図4 ナノチューブ包埋一週間経過後のナノチューブの原子構造（超高压電顕）。

（4-1：明視野像、4-2、4-3：高分解能 TEM 像）

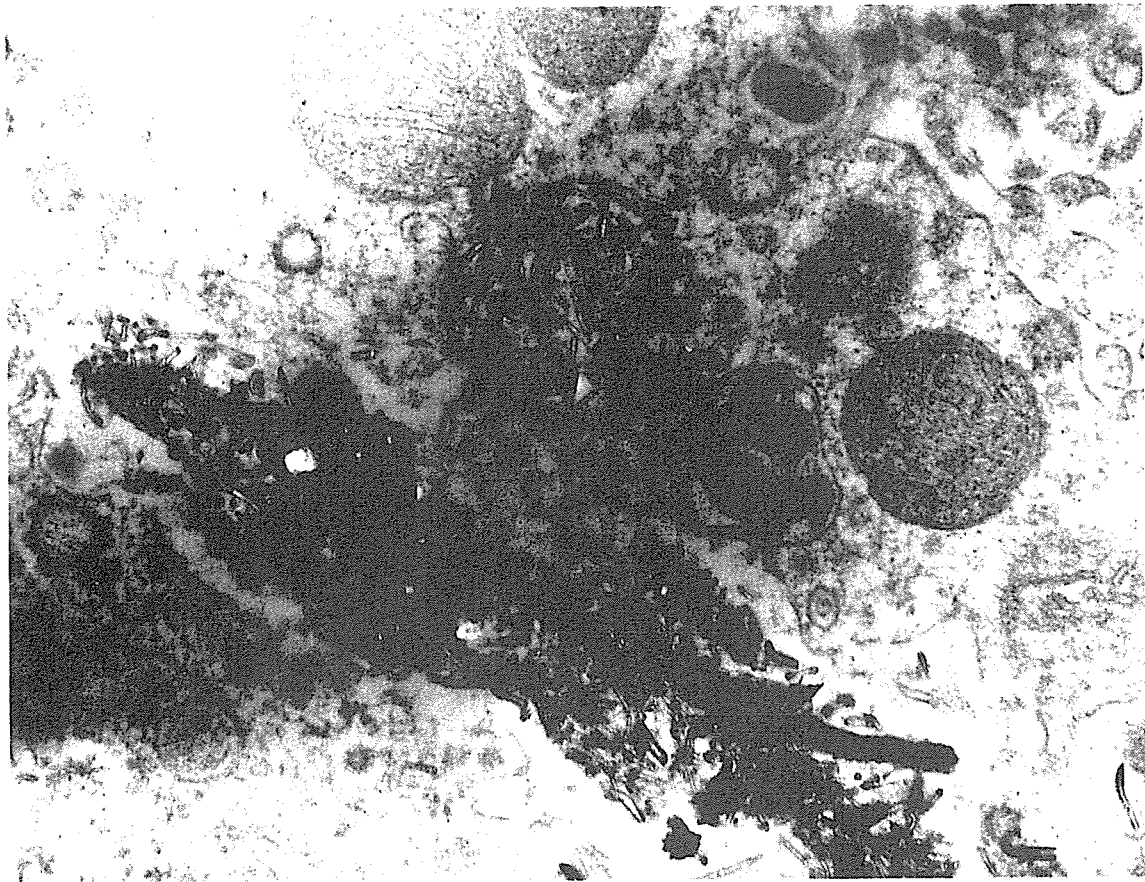


図5 ナノチューブ包埋一年間経過後のナノチューブ分散状況（低加速電顕）。

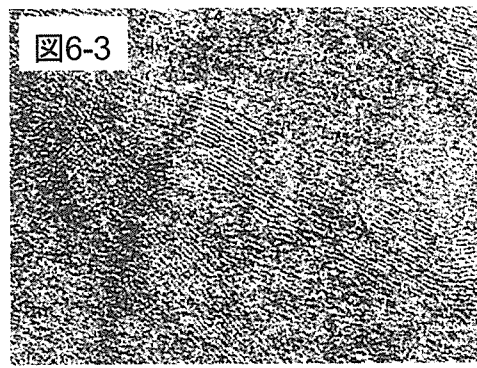
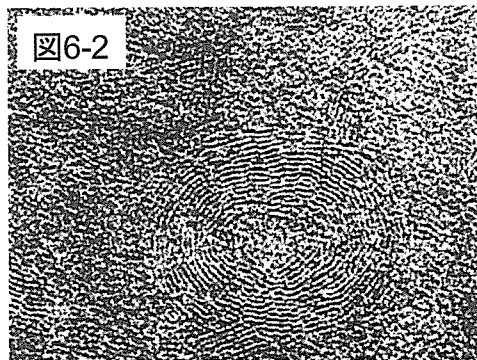
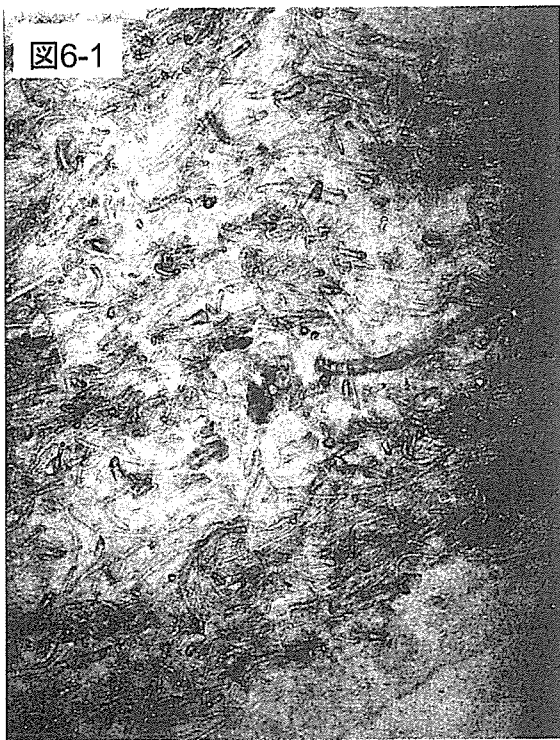
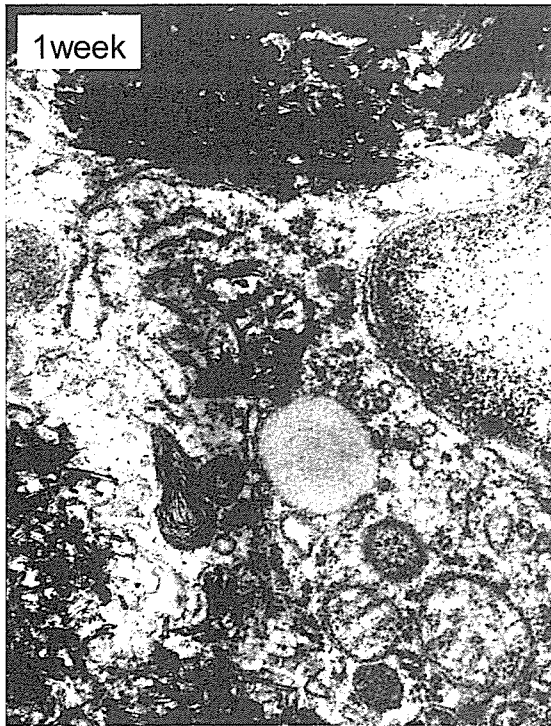
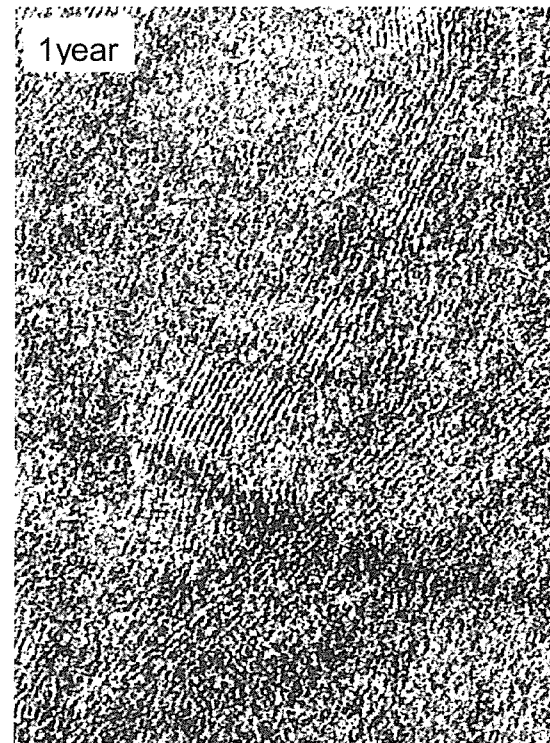
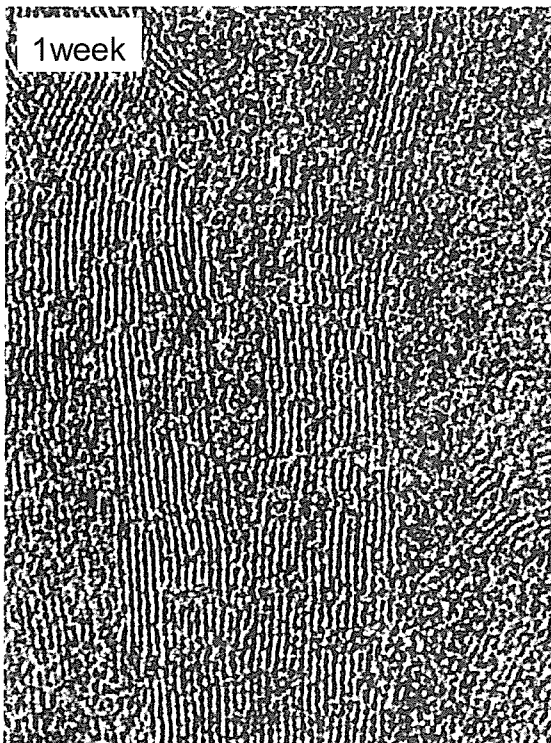


図6 ナノチューブ包埋一年間経過後のナノチューブの原子構造（超高压電顕）。  
 (6-1：明視野像、6-2、6-3：高分解能TEM像)



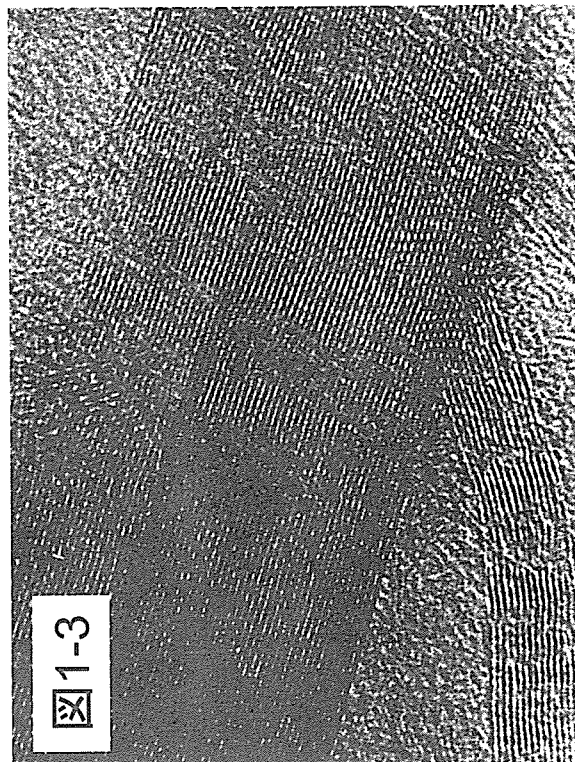
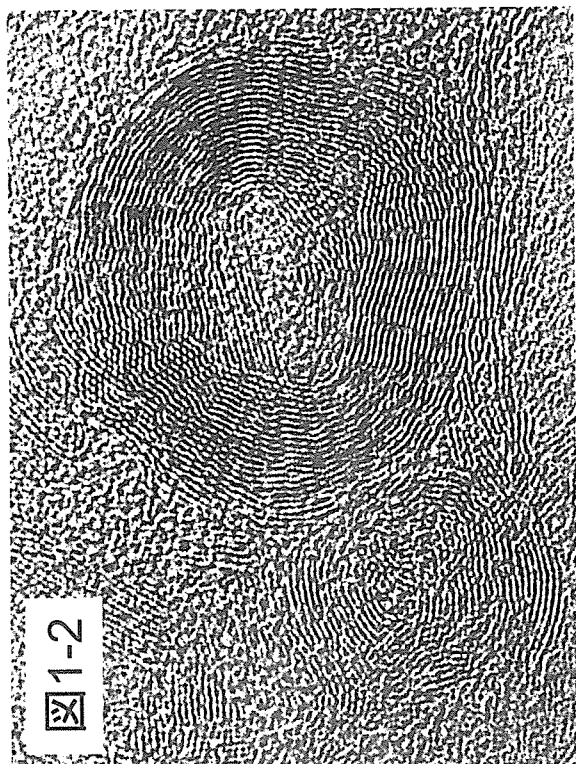
400nm

図7 ナノチューブ包埋一週間ならびに一年間経過後のナノチューブ分散状況（低加速電顕）。



4nm

図8 ナノチューブ包埋一週間ならびに一年間経過後のナノチューブの原子構造（超高压電顕）。

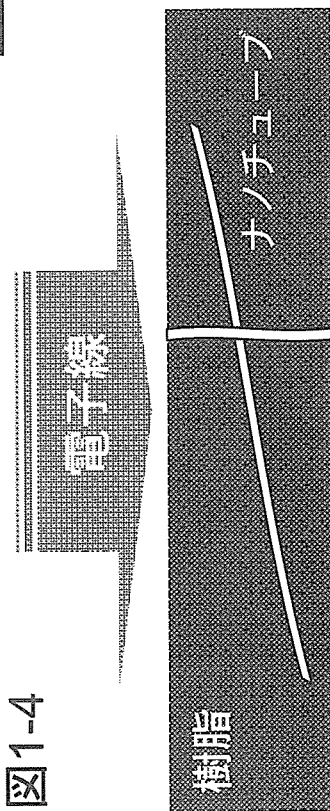


4nm



50nm

図1-4





200nm



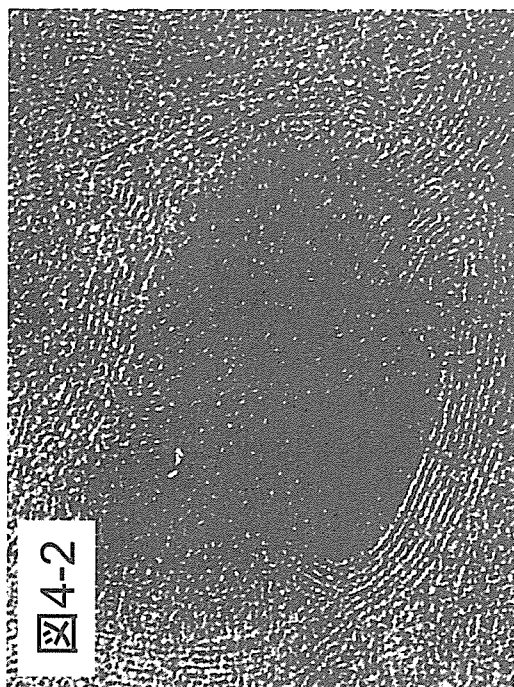


图 4-2

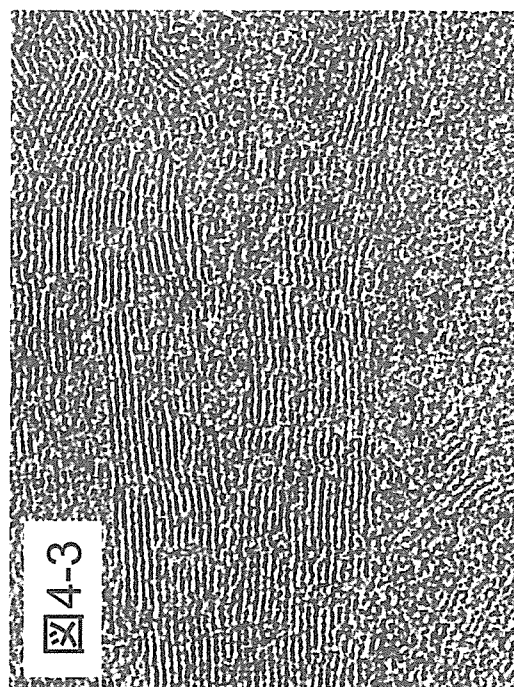


图 4-3

4nm

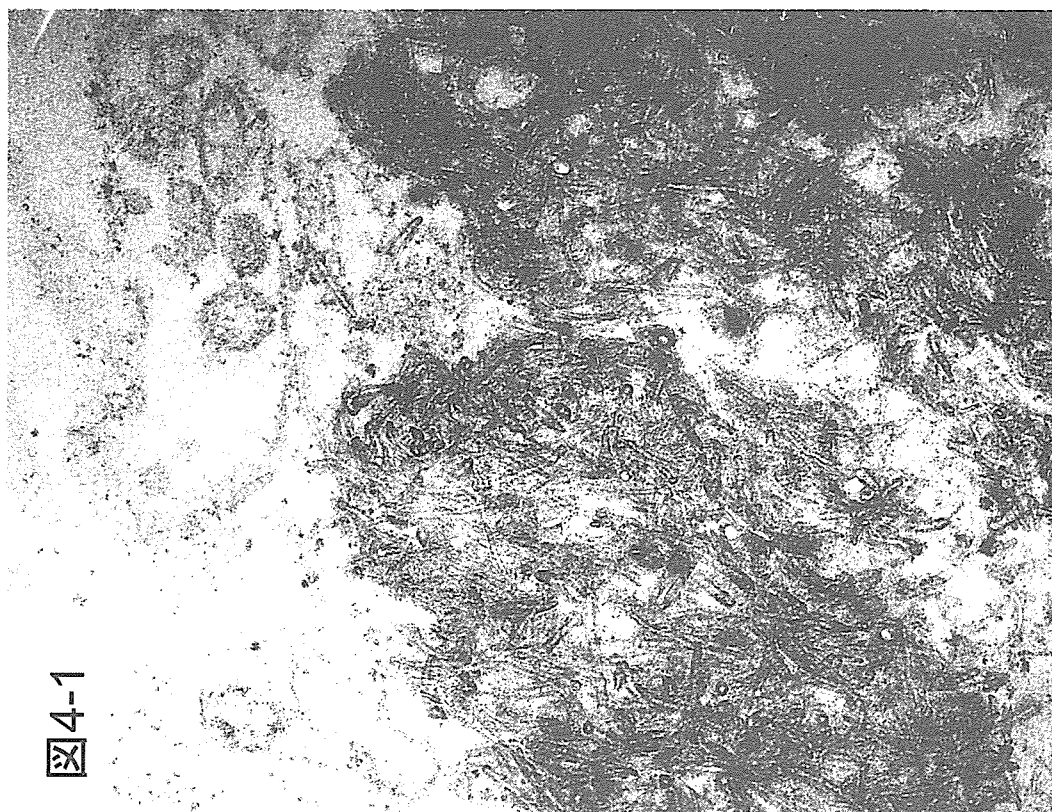


图 4-1

100nm





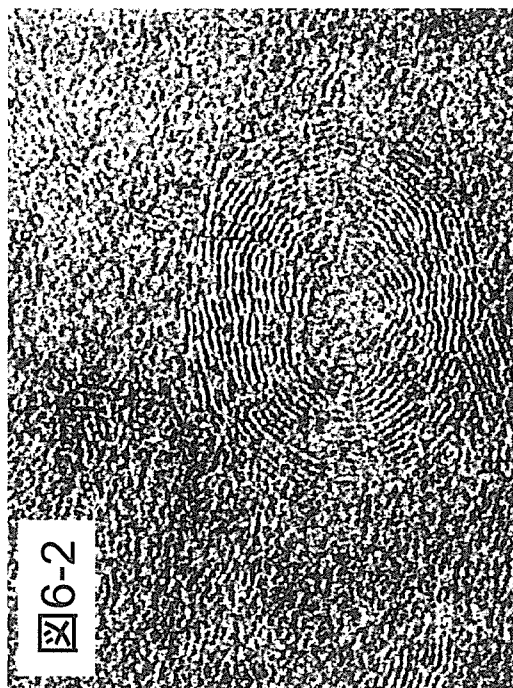


图6-2

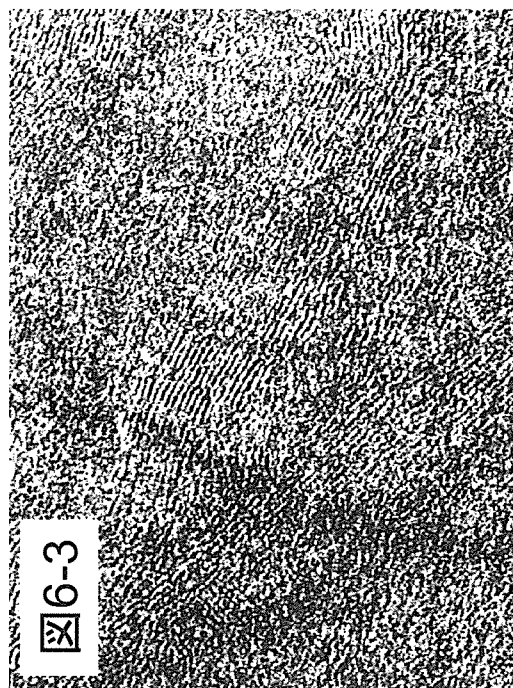


图6-3

4nm

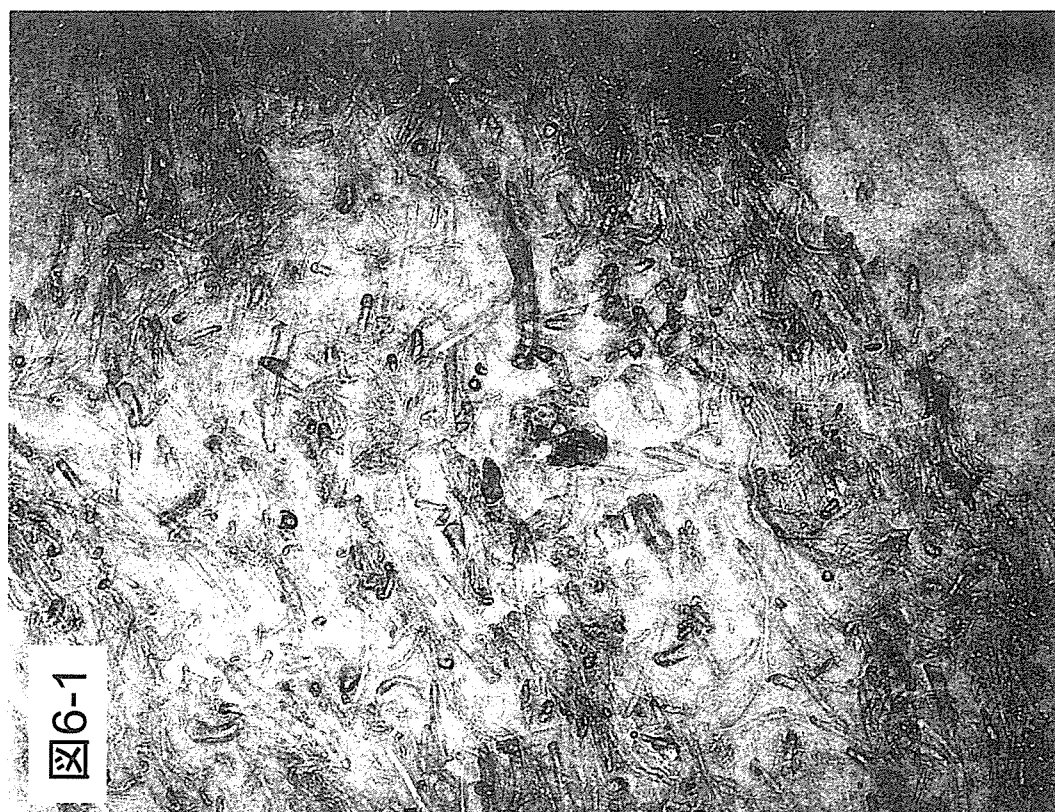
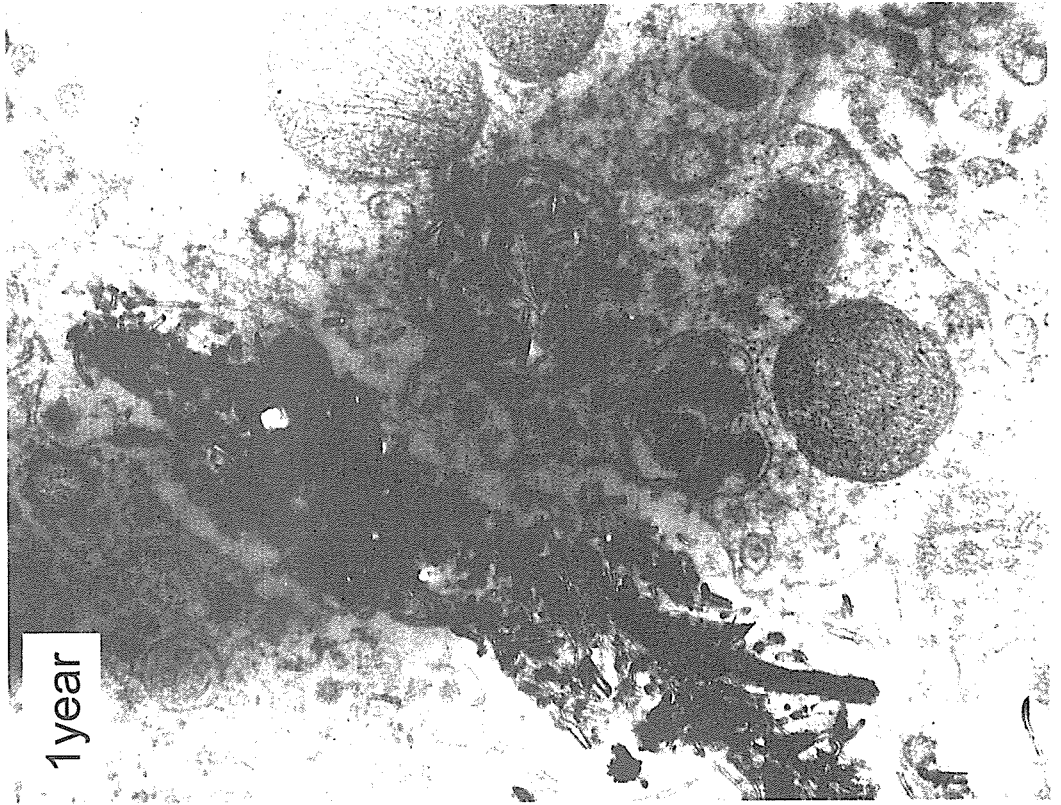
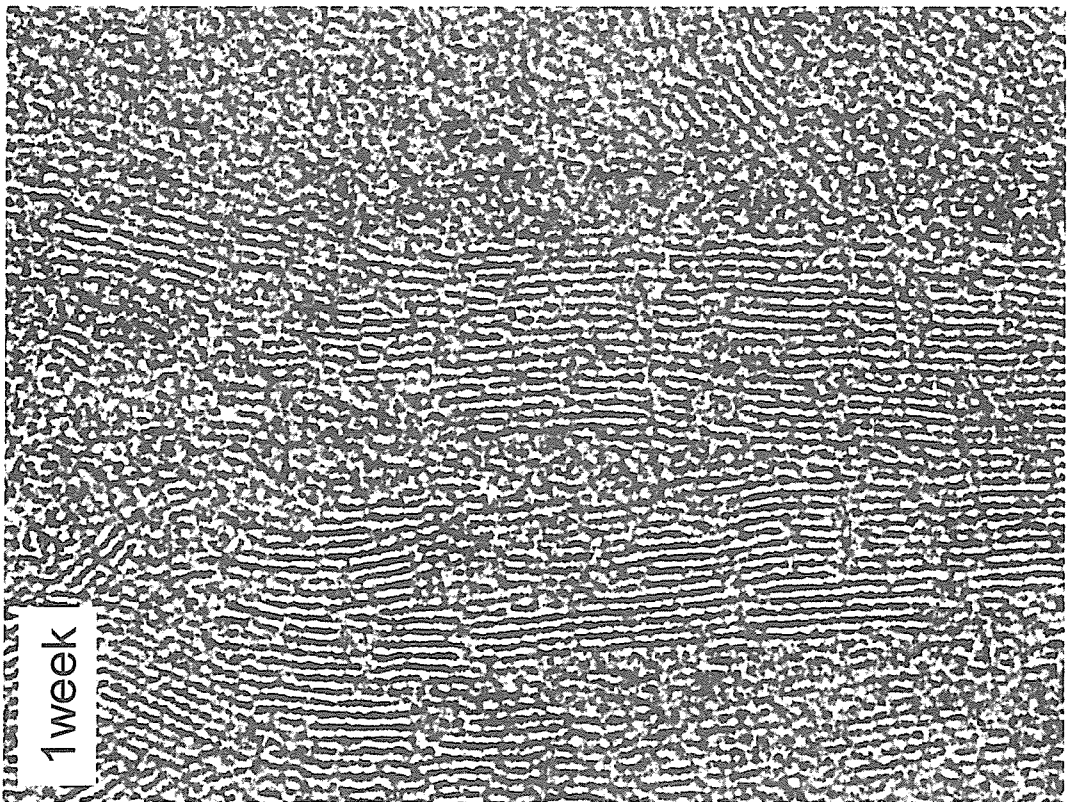
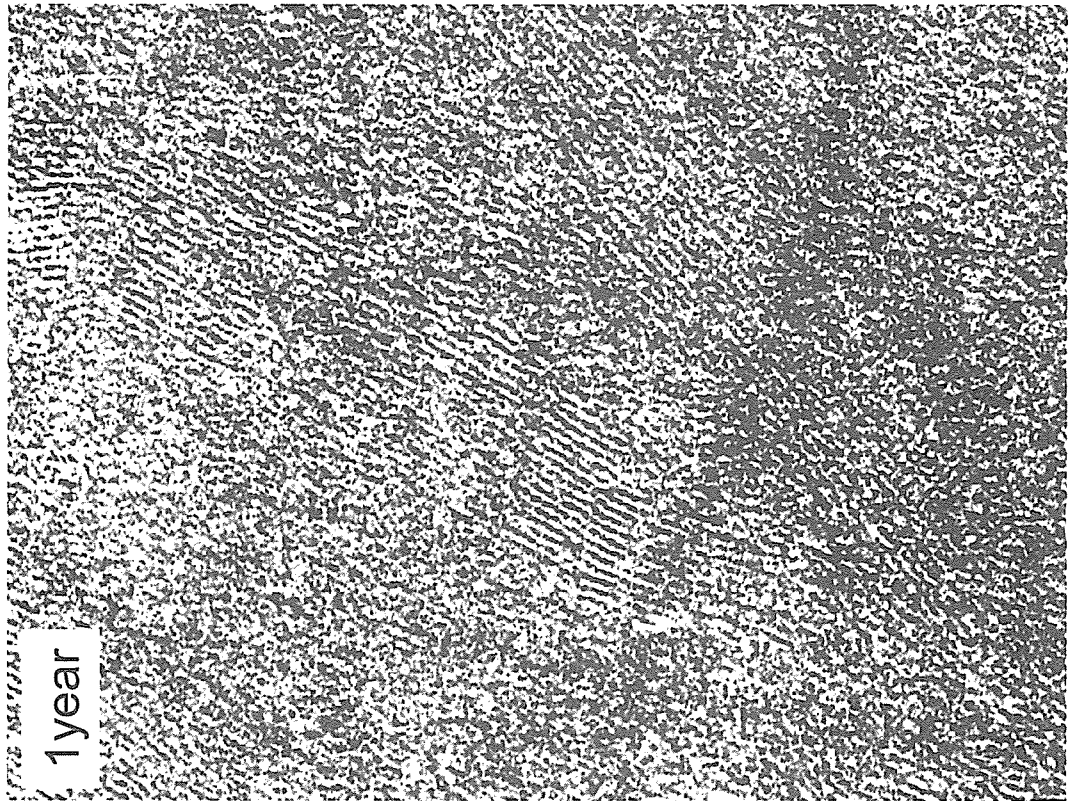


图6-1

100nm



400nm



4nm

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  
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

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	芳賀信幸	石巻専修大学理工学部生物生産工学科教授
研究協力者	羽田紘一	石巻専修大学理工学部情報電子工学科教授
研究協力者	阿部大基	石巻専修大学理工学研究科生命科学専攻大学院生

**研究要旨** ナノ微粒子の細胞および生体に対する親和性と毒性を評価するシステムの確立は緊急課題の一つである。本研究においては、単細胞真核生物であるゾウリムシが多機能同時発現細胞であることに着目し、任意のナノ微粒子の細胞親和性および細胞毒性を短期間で、迅速に評価する方法の確立を目的として、カーボンナノチューブ、カーボンナノファイバーなどの棒状ナノ微粒子、フェライト系磁性ナノ微粒子、生体親和性が高いとされるチタンの酸化物ナノ微粒子、およびナノ微粒子としては細胞毒性に関してほとんど検討がなされていない銀ナノ微粒子を用いて、ゾウリムシの細胞内取り込み能力、細胞増殖および生存能力、子孫の生存率などを評価項目として検討した。細胞内取り込み能力に関しては、高い取り込み率を示した粒子から、全く取り込まれなかった粒子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、ナノ微粒子によって異なる細胞応答が認められたが、培養液中で数十 mg/ml という非常に高い分散状態でカーボンナノチューブとカーボンナノファイバーが示した細胞毒性と、生理食塩水中で数  $\mu$ g/ml という低い分散状態でも強い細胞毒性を示した銀ナノ微粒子の場合を除くと、細胞に対する為害性は認められなかった。また、接合過程の初期と後期に投与して子孫の生存率に対する影響を検討した実験では、例外的な一つのケースを除いて、子孫の生存率に対して影響を与えている知見は得られなかった。カーボンナノチューブとカーボンナノファイバーに見られた細胞毒性は、これらの粒子による過剰な食胞形成の促進によってもたらされている可能性が示唆されたため、今後、食胞の過剰形成による細胞内自己消化の可能性を検討することが重要であると考えられる。また、銀ナノ微粒子の毒性は細胞の膜電位制御系の崩壊と関連している可能性が示唆されたので、次の検討段階では、膜電位依存性イオンチャネルの活性制御との関係で毒性発現のメカニズムを検討する予定である。子孫の生存率に対する影響で見られた例外的な為害性は、ゾウリムシの接合過程に種特異的に表れる現象に対しての影響であり、生物一般に当てはまる普遍的な現象とは云えないので、細胞毒性の評価項目に加えることは適切ではないと判断する。総じて、本研究で検討したナノ微粒子は、溶液中の分散量の制御が適切に行われる状況の下では、細胞に対する為害性は低いという見解を支持するものである。今後は、各ナノ微粒子の危険分散量値の設定に向けて検討することが必要である。