

A. 研究目的

ナノテクノロジーは現在の IT 産業やバイオテクノロジーの分野に新たな機能性を生み出す高いポテンシャルを持つ科学技術として、少子高齢化社会を支える最も重要な産業の一つと考えられている。

ナノテクノロジーでその応用が期待される材料は素材、物性、サイズなどの点で極めて多岐に亘っており、また、様々な材料を生産する上で、予測されない副産物の形で生成される場合もあると考えると、環境や人体への影響は計り知れないリスクを併せ持つと考えなければならない。

カーボンナノチューブにおける生体補強材、ドラッグ運搬体、生体 IT 基盤材などに対する期待、磁性ナノ微粒子の高感度医療検出機器への応用、高周波磁界下での温熱療法、生物が持つバイオマグネティックコンパスの応用などへの挑戦、等々すでに我々の生活と密接な関わりを持っていることはもはや疑うべくも無い。

しかるに、ナノ微粒子に対する生体安全評価に関して、産業界の現況は材料や研究対象の特殊性に依存した個別的かつ局所的な安全対策に留まっており、官学によるナノテクノロジー全般に共通する普遍性の高い安全基準設定への取り組みが急務であると考ええる。

このような状況にあって、我々は世界に広く分布する単細胞個体であるゾウリムシを一つのモデル生物として捉え、ナノ微粒子の細胞毒性を検証し、評価基準の設定に向けた基礎的研究と、安定性の高い高感度の細胞毒性検出システムの開発を目指すことを本研究の主要目的とした。

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は淡水域に棲息する単細胞真核生物で、起源は約 5 億 4 千万年前に起こった真核生物の大出現 (真核生物のビッグバン説) の際に、哺乳類や高等植物などと期を同じくして出現したとされている。

ゾウリムシの細胞体は長軸約 180 μm 、短軸 20-30 μm の回転楕円体をしており、体表は約 4000 本の繊毛で覆われている。繊毛は、遊泳、摂食、性的細胞認識などの重要な機能を持つ細胞小器官である。ゾウリムシの生活史は、有性生殖、核の世代交代、性的成熟過程、細胞老化および老衰からクローンとし

ての死へと続く点で、ヒトと共通する特徴を有している。

また、遺伝形質の子孫への伝播はメンデルの法則に従い、さらに、細胞機能の発現様式も多細胞生物と共通する仕組みによって支えられているため、遺伝学だけではなく、電気生理学、細胞生理学などの分野でも古くから多細胞生物のモデル細胞として研究の対象とされてきた。

ゾウリムシ属は自然界では古草菌や大腸菌のような細菌類を好んで餌とするが、完全合成培地で飼育できる種もあることから、外界からの栄養分の摂取には、粒子性の物質を取り込むファゴサイトーシスと可溶性の物質を取り込むピノサイトーシスの両作用を状況に応じて使い分けていると考えられる。

本研究では、ゾウリムシを多機能同時発現細胞と位置づけて、1 細胞を 1 個体として扱い、様々なナノ微粒子の摂取行動とその細胞毒性について評価し、ナノ微粒子のバイオ応用への可能性について考察する。

B. 研究方法

① 磁性ナノ微粒子の合成

ニッケルフェライト (NiFe_2O_4) とコバルトフェライト (CoFe_2O_4) は通常用いられている化学共沈殿法とそれに続く熱処理法によって合成した。スピネルフェライト前駆体は ferric salt と Ni salt または Co salt を含む水溶液を NaOH アルカリ溶液で中和することによって沈殿化し、種々の温度で加熱することによって様々なサイズの粒子からなるフェライト粉末を調製した。本実験で用いたサイズは、数ナノメートルから数十ナノメートルのものである。

② 多層カーボンナノチューブ (MWCNT)・カーボンナノファイバー(CNF)の調製

多層カーボンナノチューブ分散液は NanoLab 社 Multi walled CNT (番号 A1) を用いて調製した。また、カーボンナノファイバー分散液は Tohji (東北大

学、仙台)によって合成されたものを用いて調製した。

③ ゾウリムシの培養

ゾウリムシの培養は樋渡の方法に従った。1.25%になるようにレタスジュース(サラダ菜を用いて作製)をK-DS(0.6 mM KH_2PO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 2 mM $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, 1.5 mM CaCl_2 , pH 7.0)に溶かした溶液にバクテリア(*Klebsiella pneumoniae*)を接種し、25°Cで一晩静置したものを使用した。

ゾウリムシはSyngen 3に属する接合型EタイプとOタイプのものを用いた。

④ 細胞への取り込み実験

ナノ微粒子分散液が均一になるように超音波処理してから、マイクロピペットで必要量を取り、K-DSで希釈して用いた。取り込み実験は室温(24–25°C)で生物実体顕微鏡の下で行った。

ナノ微粒子取り込んだ細胞の撮影は顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ(ニコン、Coolpix990)によって行った。

⑤ 細胞毒性試験

細胞毒性試験は1細胞テスト法で行った。滅菌済みのデプレッションスライドグラスにナノ微粒子分散液を100–200 μl 入れ、1細胞を加えて、25°Cに静置し、所定の時間に生存の有無を確認した。

C. 研究結果

C-1. カーボンナノチューブの細胞内取り込み

図1-1にCNFを取り込んだゾウリムシの写真を示す。用いたのは接合約50回分裂した若い成熟期の細胞で、CNF分散液(K-DS溶液中に50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で分散)中に20分間インキュベートした後、スライドグラス上でK-DSに溶かした2.0%メチルセルロース溶液中に封入し、生きているままの状態をデジタルカメラで撮影した。約30個の食胞が細胞質に分散しているのが分かる。

図1-2には、CNFを含まないK-DS溶液で同様にインキュベートした細胞の写真を示した。生細胞を微分干渉顕微鏡(対物レンズ:20倍)で観察すると、透明な食胞と細胞口のほかに2個の収縮胞も確認できる。このように、ナノ微粒子は食胞の中で濃縮され、黒色の球状体として数を数えることができるので、この黒色食胞の数を指標としてナノ微粒子の細胞内取り込みを評価した。

図1-3には、培養液中にMWCNTを分散させた溶液(50 ng/ μl)にゾウリムシを入れ、10分間のインキュベーションの後に撮影した写真を示す。この写真は、ゾウリムシをスライドグラス上で乾燥させた後、封入剤(ダイヤテックス)で封入してから撮影したものである。この条件ではゾウリムシは一度乾燥しているが、食胞は崩壊することなく形態を維持したままである。MWCNTを取り込んだ黒色食胞が約40個分散しているのが分かる。

以上のように、ナノ微粒子がゾウリムシの細胞内に取り込まれる過程は、生細胞でも乾燥による固定細胞でも定量的に把握することが可能である。

次に、K-DS溶液に分散したMWCNT(50 ng/ μl)の細胞内取り込みのタイムコースを図1-4に示す。MWCNTを含んだ食胞はインキュベーション開始5分後から30分後までの間で、平均1分間に1個の速さで形成された。

細胞毒性試験とは直接関わりはないが、MWCNTの取り込みと排泄に関して、ゾウリムシに面白い性質があることがわかった。MWCNT分散液にゾウリムシを入れると、初めの3分間はほとんどMWCNTを取り込まず、約4分後から取り込みを開始するのである(表1-1)。また、図1-4にもその傾向が現れているのであるが、ゾウリムシは一度細胞内に取り込んだMWCNTは繰り返し細胞内に取り込むことは無いようである。ここでは、この性質の根拠となる観察結果は示さないが、ゾウリムシはMWCNTを凝集させるような物質でくるめて、MWCNTを凝集体の形で排泄するようである。

MWCNTの排泄速度に関しては図1-5に示した。MWCNT分散液中で60分間インキュベートしたゾウリムシをK-DSで洗い、MWCNTを含まないK-DS中に入れて、時間経過とともに細胞内の黒色食胞をカウントした結果である。黒色食胞は1分間に1.2個の割合で排泄されることがわかった。

次に、MWCNT を培養液中に分散させた溶液中でのMWCNTの取り込みとK-DS中での取り込みを比較した。図1-6に示すように、培養液中では、ゾウリムシはK-DS中での取り込みの2倍以上の効率でMWCNTを取り込んだ。また、排泄に関しては、培養液中で取り込んだMWCNTを約300分後でも細胞内に保持している細胞が見られたことから、K-DS中よりもはるかに長時間にわたってMWCNTを細胞内に保持していることが明らかになった(図1-7)。

C-2 磁性ナノ微粒子の細胞内取り込み

磁性は、ナノ化に伴いバルクの状態とは異なる特異な物性が顕現することが指摘されている。今後、医療検出器用の素材としての活用や磁氣的発熱特性の医療への展開などを視野に入れると、磁性ナノ微粒子の細胞毒性を把握しておくことは重要な課題である。

CoFe₂O₄ をゾウリムシに与えた場合の細胞応答と毒性を評価するために、MWCNTと同じ条件で細胞内への取り込み特性について検討した。図2-1に図1-1と同様に食胞に取り込まれたCoFe₂O₄粒子の状態を生きている細胞のまま撮影したものを示した。この場合、CoFe₂O₄粒子は食胞全体には広がらずコンパクトに凝集しているのがわかる。

図2-2に示すように、ゾウリムシはCoFe₂O₄粒子をMWCNTとほぼ同程度に取り込むことがわかった。K-DS中での取り込み速度は1分間に平均1.3個であった。また、排泄速度は1分間に0.6個であった(図2-3)。

一方、金属の中では最も生体に対して親和性が高いとされるチタン(Ti)について、酸化物である酸化チタン(TiO₂)のナノ微粒子を比較対象の素材として、ゾウリムシに対する影響を検討した。データとしては示さないが、TiO₂粒子もMWCNTやCoFe₂O₄粒子と同様にゾウリムシに良く取り込まれた。取り込み開始から30分間における一分間の平均食胞形成数は1.3個であった。また、細胞内で食胞数が定常状態になった時の平均食胞数は30個で、K-DSに戻されてからのTiO₂食胞の排泄速度は一分間に0.6個であった。

次に、CoFe₂O₄とTiO₂の細胞分裂に対する影響について検討した。培養液にそれぞれのナノ微粒子が100μg/mlになるように加え、1細胞培養法によっ

て、継時的に細胞数を測定することにより、細胞分裂速度を算出した(表2-1)。その結果、これら、2つのナノ微粒子はゾウリムシの細胞分裂には全く影響を与えないことがわかった。

次に、CoFe₂O₄とTiO₂の子孫の生存率に対する影響について検討した。ゾウリムシは接合という有性生殖過程を経て、親の生殖核から次の世代の新しい核(体細胞核と生殖核の両方)を作ることによって、子孫を残す。表2-2に示すように、接合完了後に子孫が生存する割合が高い系と低い系を用いて行った実験では、接合開始直後から3時間に亘って投与した場合には、為害性を示すような影響は全く認められなかった。

次に、CoFe₂O₄とTiO₂を接合初期に投与した場合の結果について表2-3に示す。この実験ではCoFe₂O₄処理群の子孫の生存率が著しく低下し、統計的に有意の差が認められた。しかし、CoFe₂O₄処理群の細胞は全て死滅したのではなく、親の代の核が再生現象を起こして再び細胞の核となったために、本来ならば子孫となるべき細胞は親と同じ性質のまま細胞分裂を繰り返したのである。この現象は、大核再生とよばれ、ゾウリムシでは比較的良好に見られる出来事である。

D. 考察

D-1. カーボンナノチューブおよびナノファイバーの細胞内動態と細胞毒性

本研究で検討したカーボン製棒状ナノ微粒子はMWCNTとCNFである。両者ともゾウリムシにとっては好んで摂食するタイプの粒子であることを示唆する結果が得られた。K-DS中でのMWCNTの初期取り込み特性に関しては、投与開始後の3分間ではMWCNTはほとんど取り込まれなかったということは、ゾウリムシはMWCNTを積極的に取り込みから排除している時間帯があったことを示唆している。しかし、次の1分後からは、毎分1個の割合で食胞を形成し続けたということは、MWCNTに対する何らかの応答現象が生じたのではないかと思われる。全体として、K-DS中では細胞機能に対する毒性は認められなかった。

一方、本来の餌であるバクテリアを含む培養液中では、MWCNTの取り込みはK-DS中での取り込みよりも高い速度で行われた。取り込みを開始してか

ら数十分後には、細胞質の中が真っ黒になるくらいに MWCNT を含んだ食胞を抱えた細胞がほとんどであった。以前に報告したように、1 マイクロリットル中に数十マイクログラムもの MWCNT が含まれている培養液中では、ゾウリムシは増殖できずに死滅する。これは、細胞質内に過剰の食胞が形成されたことが原因になっているのではないかという可能性が、今回の結果から浮上してきた。今後の検討課題としなければならない。

D-2. 磁性ナノ微粒子の細胞内動態と細胞毒性

CoFe₂O₄ の細胞内取り込み特性はカーボン製棒状ナノ微粒子と基本的に大きな相違は無かった。比較対照とした TiO₂ の細胞内取り込みに関しても同様の結果であったことから、ゾウリムシは CoFe₂O₄ 粒子が有する磁性特性に対しては特別な応答はしていないと思われる。また、細胞分裂に対する CoFe₂O₄ 粒子の影響も全く認められなかった。

表3にナノ微粒子の細胞内動態の特性をまとめて表した。細胞内取り込み速度と定常期における食胞数において、ニッケルを含むナノ微粒子で若干の低下傾向が認められたが、その他の粒子では同様な傾向を示した。しかし、特筆すべき特徴が銀 (Ag) 粒子で見られた。Ag 粒子は $\mu\text{g/ml}$ のオーダーではゾウリムシに全く取り込まれないことが明らかになった。Ag 粒子は電気生理学的にも幾つかの興味深い影響をゾウリムシに与えることから、今後、システムティックに解析する必要があると考えている。

接合過程に対する影響を検討したのは今回の実験が初めてであった。CoFe₂O₄ が生存率の低い系に対して示した阻害性の効果を除けば、これらのナノ微粒子は接合過程に対しても重大な影響を与える可能性は少ないと考えられる。

CoFe₂O₄ が生存率の低い系に対して示した阻害性の効果は、その原因メカニズムを考察することは現段階では難しい状況にある。それは、大核再生のメカニズムが全く分かっていないからである。これは同じ細胞の中に共存しているながら、なぜ、一方のタイプの核だけが DNA 合成を行い、成長するのかという問題で、解決の糸口はまだ見つかっていない。ただ、CoFe₂O₄ の阻害性の効果は自然界ではほとんど問題にならないだろうと考えられる。それは、自然界では子孫の生存率が低い細胞は、結局淘汰され

てしまうからである。

E. 結論

ナノ微粒子の生体に対する毒性や親和性を評価する一環として、細胞内への取り込みと、存在様式および排泄までのリアルタイムダイナミクスに対する基礎的な検討を行った。

今回検討した7種類のナノ微粒子に関して、細胞内動態の特性をまとめることができた。また、接合過程に対する影響を評価するための基本的な実験条件を検討して、評価シート作成のための基礎データを集めることができた。

細胞毒性に関しては、Ag 粒子で他の粒子の数百倍から千倍程度の為害性が認められたことから、今後、Ag 粒子の作用機構の解明を最優先課題の一つにして検討する必要がある。

他の6種類のナノ微粒子については、危険分散量を定めるための評価項目と基準値の検定方法を具体的に絞り込む段階に入ったと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Haga and K. Haneda “*Paramecium* as a bioassay system for elucidation of cytotoxicity and biocompatibility of nanoparticles: effect of carbon nanofibers on proliferation and survival” the Japanese J. Protozool. (in press), (2007)
2. Y. Takenaka, A. Yanagi, H. Masuda, Y. Mitsui, H. Mizuno and N. Haga “Direct observation of histone H2B-YFP fusion proteins and transport of their mRNA between conjugating *Paramecia*” Gene (in press), (2007)
3. 芳賀信幸 “単細胞個体・ゾウリムシのカーボンナノチューブ細胞内摂取のリアルタイム観察”、J. Japanese Society for Biomaterials, 24, 319-323, (2006).

2. 学会発表

1. 阿部大基、芳賀信幸、“ゾウリムシの接合過程に対するコバルトフェライトおよび酸化チタンの影響”、第2回「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」研究成果発表会講演要旨集、35、徳島県、鳴門市、(2007)
2. 芳賀信幸、“リアルタイム観察によるゾウリムシのナノ微粒子摂取行動と細胞内動態” 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」研究会講演刺繍要旨集、30、宮城県、仙台市、(2006)
3. 芳賀信幸 “ゾウリムシの微粒子摂取行動と細胞毒性評価”、

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

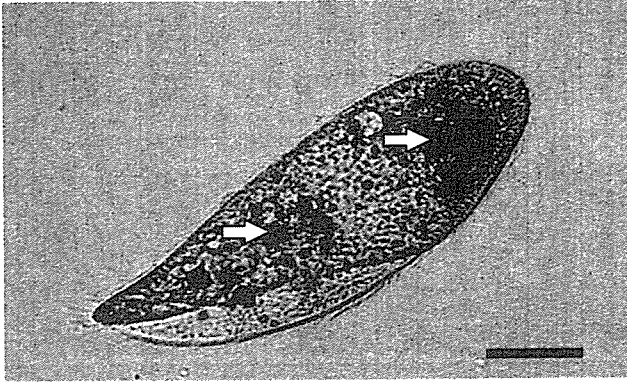


図 1-1 CNF を取り込んだゾウリムシ。

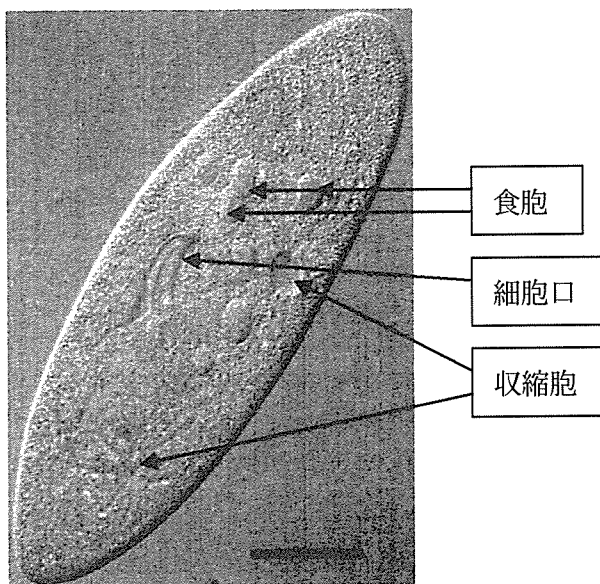


図 1-2 微分干渉顕微鏡で観察したゾウリムシ。

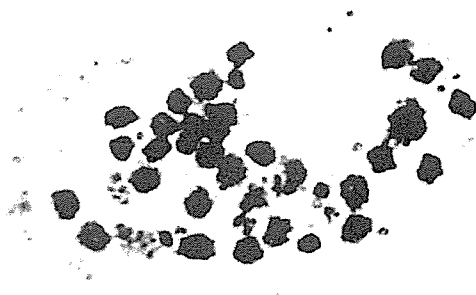


図 1-3 MWCNT を取り込んだゾウリムシ。

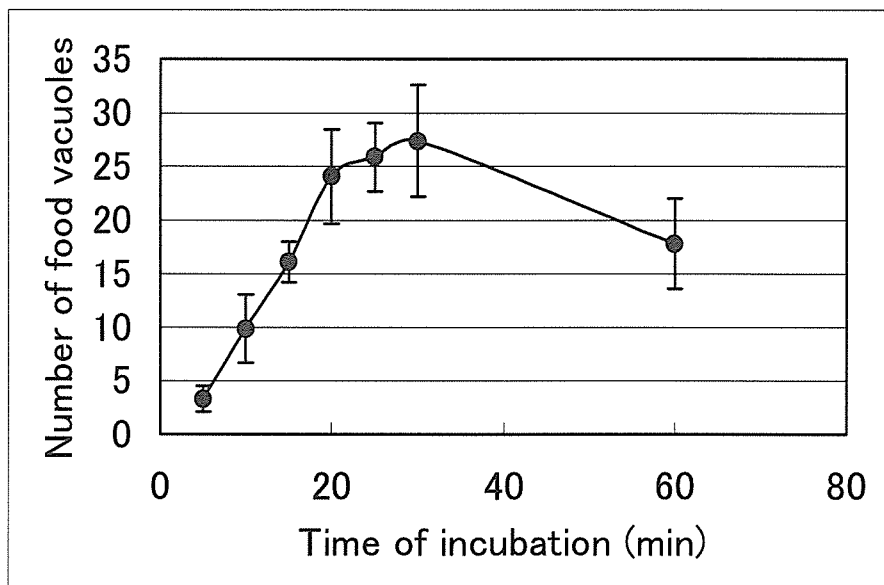


図 1-4 K-DS 中での MWCNT の取り込み。

表1 MWCNT を含む生理食塩水中での MWCNT の
初期取り込み速度

時間 (分)	食胞数 / 細胞		n	ANOVA (Tukey)
	平均	標準偏差		
1	0	0	10	a
2	0	0	10	a
3	0.7	0.9	10	a
4	1.1	0.9	10	b

多重比較による統計検定 (ANOVA, Tukey) の結果は異符号間で $P < 0.01$ で有意であることを示している。n は個体数である。

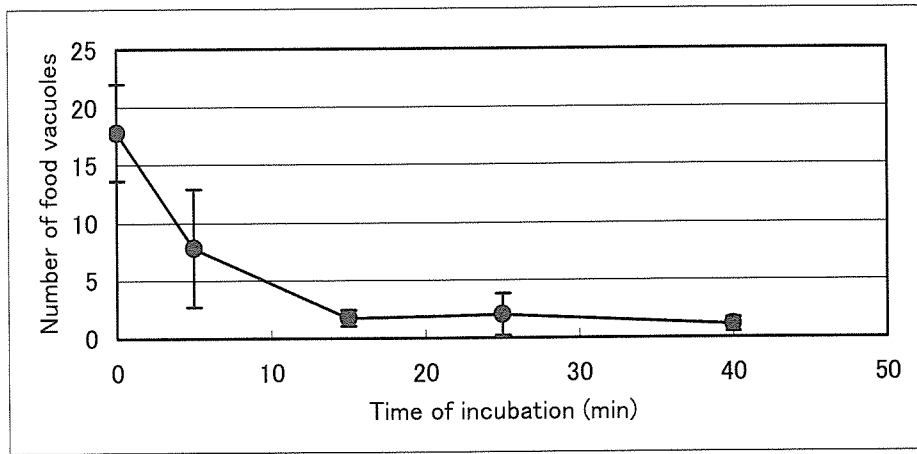


図 1-5 K-DS 中での MWCNT の排泄。

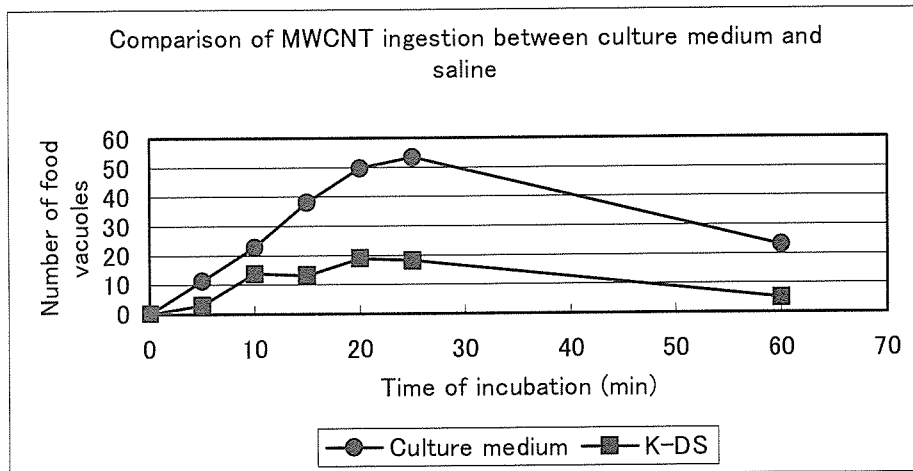


図 1-6 培養液中と K-DS 中での MWCNT の取り込み速度の比較。

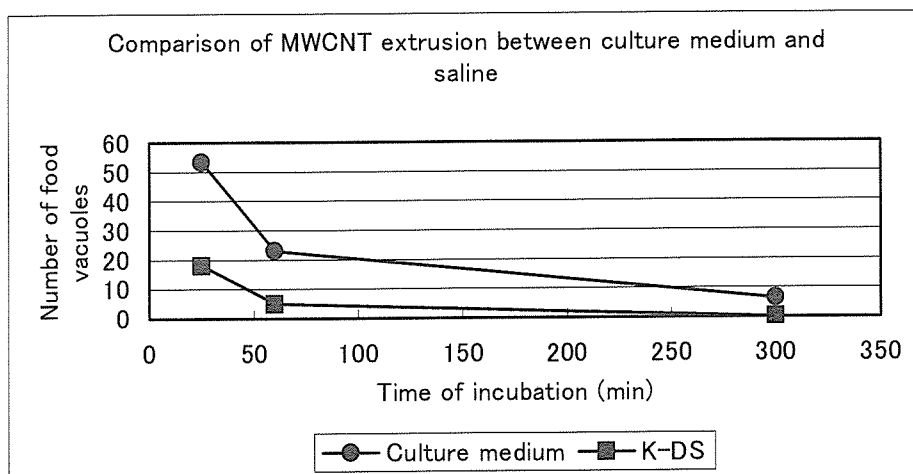


図 1-7 培養液中と K-DS 中での MWCNT の排泄速度の比較。

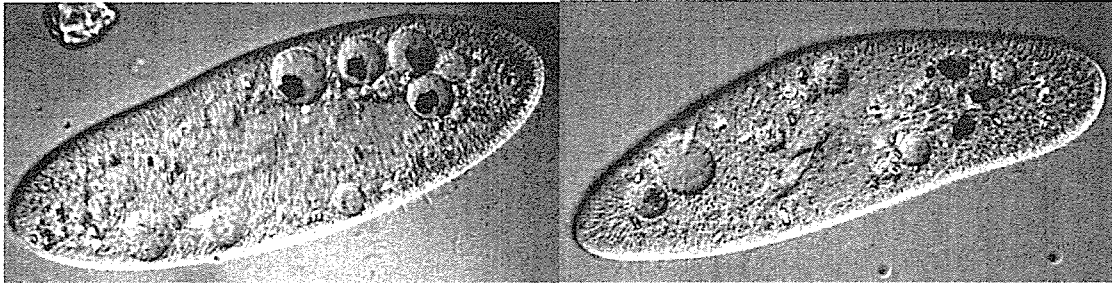


図 2-1 CoFe_2O_4 を取り込んだゾウリムシ。

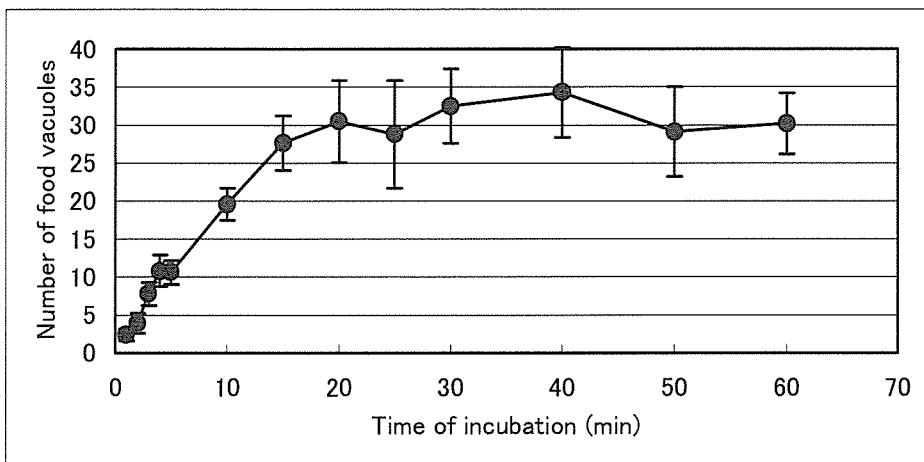


図 2-2 K-DS 中での CoFe_2O_4 の取り込み。

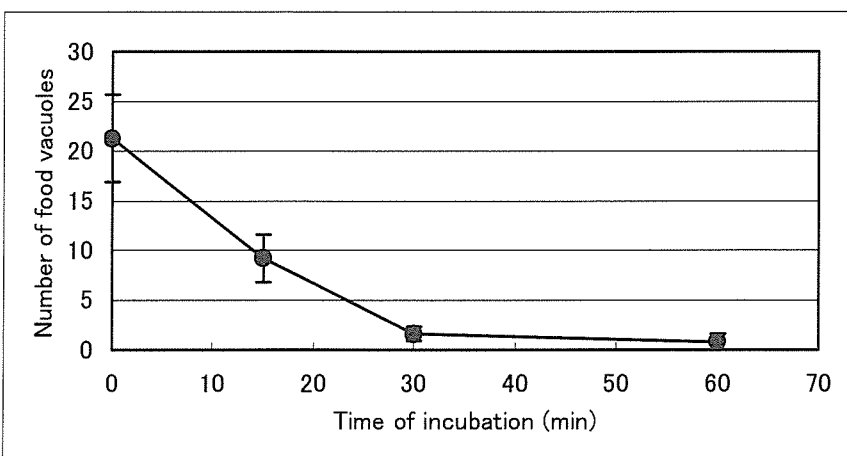


図 2-3 K-DS 中での CoFe_2O_4 の排泄。

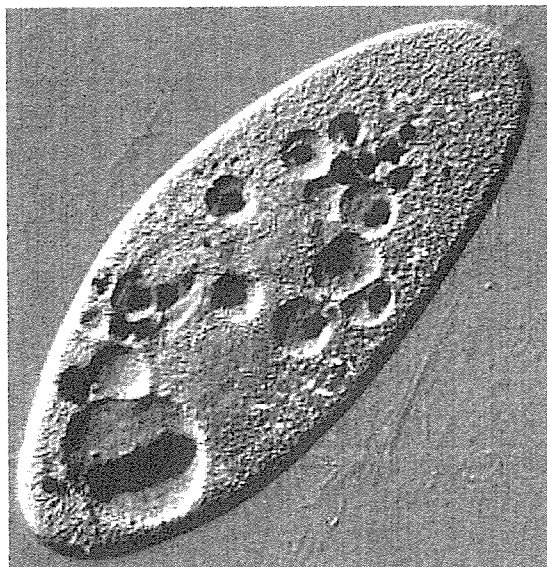


図 2-4 K-DS 中で TiO_2 を取り込んだゾウリムシ

表 2-1. CoFe_2O_4 と TiO_2 の細胞分裂に対する影響

Nanoparticles	Cells	Number of cell divisions / 24 h		
		Mean	S.D.	n
CoFe_2O_4	KNZ0423	2.3	0.4	6
	BHIII 1-S1	2.3	0.4	6
TiO_2	KNZ0423	2.2	0.5	6
	BHIII 1-S1	2.5	1.1	6
Control	KNZ0423	2.4	0.7	6
	BHIII 1-S1	2.3	0.7	6

*ナノ粒子分散液は $100 \mu\text{g/ml}$ 、control はナノ粒子を含まない培養液。
 どの実験群もコントロールと統計的に有意の差は認められない。

表 2-2. CoFe₂O₄ と TiO₂ の子孫の生存率に対する影響：
接合初期に投与した場合。

Nanoparticles	Property of survival	Survival (%)	n
CoFe ₂ O ₄	High	101.3	192
	Low	89.9	232
TiO ₂	High	88.2	192
	Low	124.8	232
Control	High	100.0	192
	Low	100.0	232

*ナノ粒子分散液は 100 μg/ml、control はナノ粒子を含まない K-DS。

*ナノ粒子は接合開始時に細胞浮遊液に加え、3 時間後に洗浄して除いた。

*High は接合後の子孫の生存率が高い系であり、Low は低い系である。

どの実験群もコントロールと統計的に有意の差は認められない。

表 2-3. CoFe₂O₄ と TiO₂ の子孫の生存率に対する影響：
接合後期に投与した場合。

Nanoparticles	Property of survival	Survival (%)	n
CoFe ₂ O ₄	High	106.3	96
	Low	0.0	70
TiO ₂	High	81.3	96
	Low	45.5	70
Control	High	100.0	96
	Low	100.0	70

*ナノ粒子分散液は 100 μg/ml、control はナノ粒子を含まない K-DS。

*ナノ粒子は接合開始後約 20 時間経過した細胞に加え、24 時間後に
洗浄して除いた。

*High は接合後の子孫の生存率が高い系であり、Low は低い系である。

*生存率が低い系における TiO₂ と CoFe₂O₄ 処理群で生存率に低下が認められた。

しかし、統計解析の結果、TiO₂ とコントロール群の間には有意の差は
認められなかったが (Fisher, P=0.18)、CoFe₂O₄ 処理群とコントロールとの
間には、有意の差が認められた (Fisher, P=0.001)。

表 3. ナノ微粒子の細胞内動態

Nanoparticles	Ingestion (Number / min)	Stationary number (Number)	Extrusion (Number / min)
Multi walled CNT	1.0	30	1.2
CNF	0.8	23	—
CoFe ₂ O ₄	1.3	33	0.6
NiFe ₂ O ₄	0.1	3	—
TiO ₂	0.8	30	0.6
NiO	0.3	10	—
Ag	0.0	0.0	—

*Number は細胞内の食胞数を表す。Stationary number は食胞数が定常期に達したときの平均値である。—は未測定。

*実験に用いた細胞はすべて子孫の生存率が高い、比較的若い細胞である。

*ナノ粒子は K-DS に分散したものをを用いた。

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

レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用
フラレン誘導体マーカの調製

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	赤坂 司	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

研究要旨 本研究では炭素系ナノ微粒子の体内動態の可視化を目的として、レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラレンマーカの調製を検討することとした。レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラレンマーカを目標化合物とし、糖鎖リガンドをフラレン（C60）に共有結合し、細胞が有するレセプターや抗原に対する親和性を持ったフラレン誘導体を分子設計した。その結果、フラレンマーカの合成を検討したところ、ガラクトースまたはグルコースが1つまたは2つ結合したフラレンの合成できた。また水酸基の導入を検討したところ所定の条件下で反応時間を延長することにより、水酸基の導入率が高く水溶性を示すフラレン誘導体を収率よく合成することができた。これらは動物試験による体内動態検討に有効であると考えられる。

A. 研究目的

近年、ナノテクノロジーが急速な進歩を遂げ、研究分野だけでなくナノテクにより生産された製品が一般市場にも見られるようになってきている。ナノ微粒子に関しては、化粧品などとして販売されているにも関わらず、安全性については詳細に検討されていないのが現状である。ナノ微粒子の安全性を検討する際には、金属微粒子であればXSAM、EPMAなどを利用して体内動態を調べる方法が挙げられる。一方、炭素系ナノ微粒子に関しては適当なイメージング方法がないのが現状である。

そこで本研究では炭素系ナノ微粒子の体内動態の可視化を目的として、レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラレンマーカの調製を検討することとした。レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラレン

マーカを目標化合物とし、糖鎖リガンドをフラレン（C60）に共有結合し、細胞が有するレセプターや抗原に対する親和性を持ったフラレン誘導体を分子設計した。

B. 研究方法

（使用した試薬）

- C-60 (MTR Ltd., 99.5+%)
- Pentaacetyl- β -D-glucose (Tokyo Kasei,)
- β -D-Galactose pentaacetate (Aldrich, 98%)
- Tetrabutylammonium hydroxide titrant (Across, TBAH, 0.4M in water, HPLC grade)
- Boron trifluoride diethyl ether complex (Wako, 46-49%)
- Sodium azide (Wako, 98%)

(Ac Gal-Br の合成)

出発原料としてアセチル化したガラクトース (1.95g, 5mmol) をジクロロメタン(10ml) に溶解し、ブromoエタノール(0.75ml, 6mmol) および $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3.55g, 25mmol) を加え、15 分間反応させた。

反応終了後、炭酸水素ナトリウム水溶液を加え中和し、クロロホルムにて抽出を行った。クロロホルム層を濃縮し、シリカゲルカラム(展開溶媒 ヘキサン：酢エチ=2:1)にて精製分離し目的物を得た。

(Ac Gal-N₃ の合成)

末端のプロモ基をアジド基へ変換するため、得られたブromoエチル アセチル化ガラクトシド(1g) を DMF(10ml) に溶解し、 NaN_3 (214mg) を加え、65°C・2 時間反応させた。反応終了後、炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムにて抽出を行った。クロロホルム層を濃縮し、シリカゲルカラム(ヘキサン：酢エチ=1:1)にて精製することにより目的物を得た。

(Ac Gal₂-C60 の合成)

糖とフラレーンのカップリング反応のため、アジドエチル アセチル化ガラクトース(58mg) および C60(100mg) をクロロベンゼン(50ml) に溶解し、10 時間還流した。反応終了後、得られた混合物を濃縮し、シリカゲルカラム(①トルエン、②トルエン：酢エチ=10:1、③トルエン：酢エチ=3:1)にて精製分離し目的物を得た。

アセチル化ガラクトース 1 結合型 C60 :
(AcGal)1-C60 = 23mg

アセチル化ガラクトース 2 結合型 C60 :
(AcGal)2-C60 = 30mg

(Gal₂-C60-(OH)_n の合成)

水溶化のため、アセチル化ガラクトースを 2 分子結合した C60 (10mg) をトルエン(5ml) に溶解し、 NaOH 2g/ H_2O 2ml および TBAH を 5 滴加えた。1 時間激しく攪拌後、エバポレーターにてトルエンを除き、50ml の H_2O を加え、さらに 24 時間反応を行った。後処理のため大過剰のメタノール(450ml) に反応混合物を加え、反応物を沈殿させた後、吸引ろ過 (PTFE, 0.2 μm) にてろ別した。メタノールにて 3

回洗浄後、60°C にて乾燥し、得られた乾燥物を H_2O に加え超音波を用いて分散させた。水に対しての不溶物を除くため、ろ過 (孔系 0.2 μm) を行った。その後、脱イオン水に対して 5 日間、透析 (Cut-off 500) を行うことにより精製し、凍結乾燥して目的物を得た。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラレーンマーカ-の合成スキームを図 1 および図 2 に示した。合成例として図 1 では糖にグルコースを選択し、フラレーンとの結合反応後に糖鎖結合部分が 1 つのものを示した。

その後のアセチル化糖の結合したフラレーン誘導体をアセチル基の脱保護および水酸基の導入を同時に行うことにより水溶化して目的物を得た (図 2)。得られたフラレーン誘導体の凍結乾燥物とその水溶液を図 3 に示した。

D. 考察

マスマッピングを行うために、既知の方法¹⁾にて合成を行った。レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラレーンマーカ-の分子設計を図 4 に示した。

- ① レセプターとの結合をより強くするため、リガンドとしての糖とフラレーンとの間にスペーサーとして炭素数 2 のエチレン基を介し結合する。
- ② C60 との結合は後でマスマッピングするため、分裂しやすいように炭素ではなく窒素 (アザ結合) を介した結合とする。
- ③ 会合状態を避けるため C60 に水酸基を多数導入し水溶性とすることとした。
- ④ 糖リガンドは、肝実質時細胞上に存在しレセプター依存性のエンドサイトーシスを起こすことが知られているアシアログライコプロテインレセプター (ASGP) に選択的に結合する β -ガラクトースとした。
- ⑤ リガンドはグリコシドクラスター効果が期待されるように C60 に対して 2 つ結合した化合物と

した。

マスマッピングマーカ―として最適な機能を付与するために、既知の方法¹⁾にて合成を行い本研究の目的に最適なように部分的な改良を検討することとした。糖鎖とC60のカップリング反応では、ガラクトースを1つ結合したC60と2つ結合したC60が同時に合成できるので、糖鎖が2つ結合した誘導体を中心的に合成した。

得られたアセチル化糖を結合したフラーレンに層間移動触媒と水酸化ナトリウムを用いて、脱保護および水酸基の導入を検討したところ、12時間の反応時間では大部分の生成物が不溶性であった。これは水酸基の導入率が分布を持つ反応であることより、不溶性の部分は水酸基の導入率が比較的低く(水酸基10~12個の導入率では水に不溶)、ミセルの様な状態になっていると考えられる。より水酸基の導入率を高めるため反応時間を24時間と延ばしたところ、水に不溶性の部分が減少することが判明した。動物試験による体内動態を検討するためには、微粒子のサイズ効果を避けるためにも水溶性の方が適切であると考えられる。また今後、水酸基の導入率を高めることにより水溶性フラーレンの収量が向上すると考えられる。

得られた水溶性フラーレン誘導体の一覧を表1に示した。それぞれの誘導体は動物組織への注入試験の検討に使用可能であると考えられる。

E. 結論

レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラーレンマーカ―の合成を検討したところ、ガラクトースまたはグルコースが1つまたは2つ結合したフラーレンの合成できた。また水酸基の導入を検討したところ所定の条件下で反応時間を延長することにより、水酸基の導入率が高く水溶性を示すフラーレン誘導体を収率よく合成することができた。これらは動物試験による体内動態検討に有効であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsukasa Akasaka, Fumio Warani, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, Apatite formation on carbon nanotubes, Material science & Engineering C, 26 (4), 675-678 (2006).

2. 学会発表

1. 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”、第2回「ナノトキシコロジーアセスとの微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会講演要旨集、p29 北海道、札幌市 2006

2. 赤坂 司、青木尚文、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捕捉とその増殖”、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、p108 三重県、鈴鹿市 2006

3. 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・東北支部夏季セミナー講演要旨集、p10 岩手県、盛岡市 2006

4. 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48回日本歯科理工学会講演要旨集、p336 愛知県、名古屋市 2006

5. 赤坂 司、阿部薫明、宇尾基弘、亘理文夫、“カーボンナノチューブ上でのアパタイトの析出”、第3回「ナノトキシコロジーアセスとの微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会講演要旨集、p18 宮城県、仙台市 2007

6. 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講演要旨集、p10 北海道、札幌市 2007

7. 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要旨集、p17 北海道、札幌市 2007

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案取得

特になし

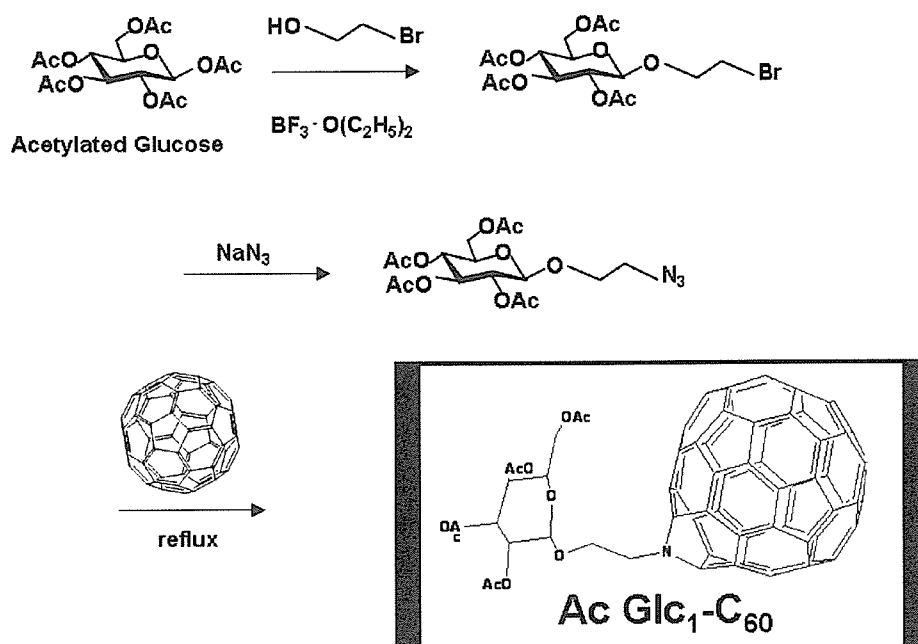


図1 合成スキーム (1)

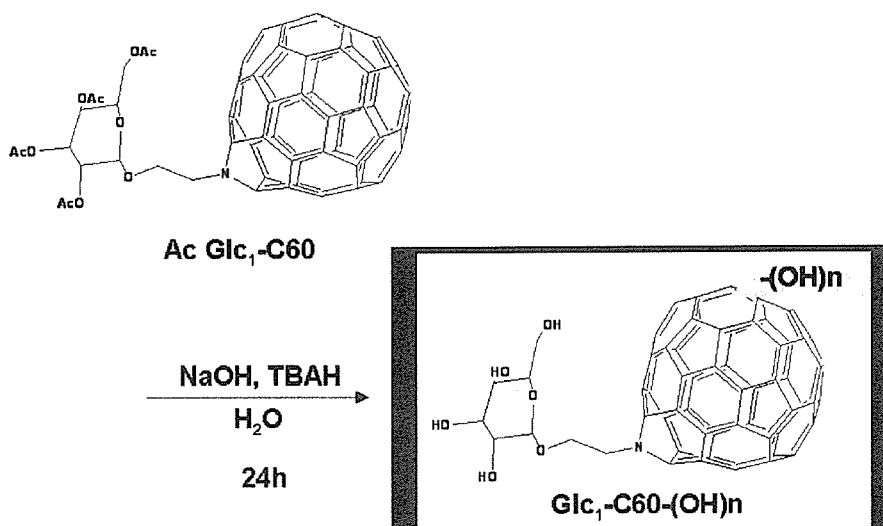


図2 合成スキーム (2)

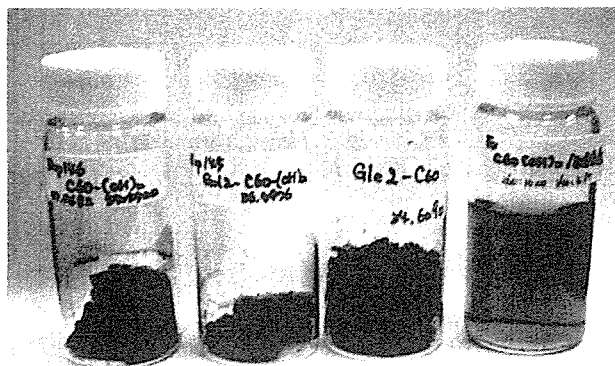
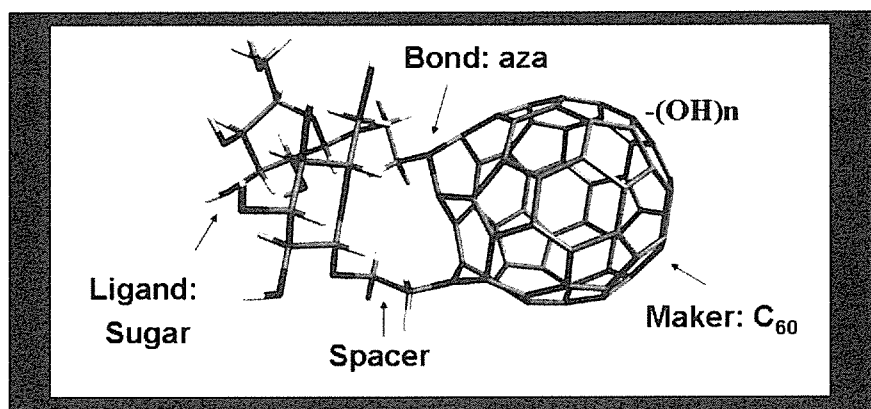


図3 フラーレン誘導体
(凍結乾燥物および水溶液)

Molecular Design: フラーレンマーカ-



- ① 容易な合成
 - ・ 反応条件下で安定
 - ・ ステップ数 少い
- ② C60へNIにて結合
- ③ レセプター親和性
 - ・ スペーサー
 - ・ 糖が2付加
- ④ -OH導入水溶性化

図3 フラーレン誘導体の分子設計

表1 調製した糖鎖結合型フルーレンの一覧

フルーレン誘導体	略号	1回目試験	2回目試験
ガラクトース1結合型水溶性C60	Gal ₁ -C60(OH) _n	○	
ガラクトース2結合型水溶性C60	Gal ₂ -C60(OH) _n	○	○
グルコース1結合型水溶性C60	Glc ₁ -C60(OH) _n	○	
グルコース2結合型水溶性C60	Glc ₂ -C60(OH) _n	○	○
水溶性C60	C60(OH) _n		○

注) ○は動物試験に使用した化合物を示す。

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

生体と無機ナノ粒子のかかわりと応用に関する研究

主任研究者 亘理文夫
研究協力者 米澤 徹

北海道大学歯学研究科教授
東京大学大学院理学系研究科助教授

研究要旨 本研究においては、生体と無機ナノ粒子のかかわりとその応用について検討を重ねる材料として以下の金属および金属酸化物のナノ粒子製造を行った。無機ナノ粒子と生体のかかわりについては、その粒子の材質、表面に吸着している分子、大きさ、形状、表面電位など、様々なファクターが関与することが考えられる。そこで、今回、生体に親和性の高い高分子を保護剤として使用したナノ粒子の調製、比較的大きな金属ナノ粒子の大量調製、さらには金属表面を保護剤などの有機分子でコートせずに安定に水中に分散させた金属ナノ粒子の調製について試験・検討を行った。

A. 研究目的

ナノ材料に対する関心が近年高まってきており、様々な物質のナノ化が行われてきた。こうしたナノ粒子は、バイオセンシング、抗菌作用、色材、磁性材料、触媒、電子材料、電極材料、配線材料、担体、光学材料などに幅広い応用が期待されている。特に、その中でも金属や金属酸化物のナノ粒子は近年多目的な応用が期待され、新規材料として沢山の研究が報告されている。

ナノ粒子と生体とのかかわりについても、近年大きな研究対象となっている。従来から、例えば、金ナノ粒子を利用した電子顕微鏡の生体サンプルの染色であったり、吸収波長が粒子の大きさや凝集形態によって変化するプラズモン吸収と抗原抗体反応を利用した特定のタンパク質の存在の実証、例えば、妊娠検査薬などに利用されている。また、金や銀のナノ粒子が示す可視光領域のプラズモン吸収は、これらを重要な色材として活用される原因となっており、自動車塗料などにも使用され始めている。また、焼結と組み合わせ、金属光沢を出すための色材としても利用されている。また、白金族のナノ粒子はこれまで様々な化学反応のための触媒として利用されてきており、最近では、活性酸素除去能があるこ

とが示され、より生体とのかかわりの深い場面で使用され始めている。一方、金属酸化物のナノ粒子は、化粧品用途はもちろんのこと、チタニアは、光触媒や白色顔料として多用されている。また、マグネタイトなどの磁性粒子は、ハイパーサーミアなどの磁気医療分野への展開も図られている。

こうしたナノ粒子の展開のスピードに対し、生体とのかかわりを真に捉えた研究は非常に少ない。ナノ粒子をエアロゾル中に含有させて使用することなどもあり、化学者は、こうしたナノ粒子の利用の促進と同時にその影響についても示していかなく必要があると思われる。

そこで、本研究協力者は、生体とのかかわりを検証するための代表的なナノ粒子を製造し、試験することを目指した。

本年度は、生体とのかかわりを検証する上で必要となるナノ粒子について製造・開発した。その内容は3種類であり、①生体関連の高分子をナノ粒子周囲に吸着する保護剤として用いた場合、②生体適合性のよい有機酸を保護剤として用いて水中に分散させた粒子径の比較的大きな金属ナノ粒子、③こうした保護剤を表面にもたず、なおかつ水中で分散することのできるナノ粒子である。今後、これらの粒子

などを用いた生体とのかかわりとその応用に関して研究を重ねて行きたいと考えている。

B. 研究方法

ナノ粒子の製法は個々の事例に適切なものを選択した。その結果、いずれの方法の湿式法であり、①については、保護高分子としてゼラチンを用い、 NaBH_4 を還元試薬として用いた方法である。②については、クエン酸を還元試薬とし、保護分散もこのクエン酸が担っている(DLVO)。③保護剤は使用せず、レーザーアビュレーション法によってナノ粒子を生成させた。

いずれの粒子についても、粒子径・形状などについては、透過型電子顕微鏡観察によって行い、それぞれに対応した分析方法によって分析した。②のクエン酸保護銀ナノ粒子については、生体とのかかわりを検討するために、金魚をこのナノ粒子の存在下、飼育する試験を行った。

C. 研究結果

①の生体関連高分子としては、ナノ粒子の保護・分散剤として古くから検討されているゼラチンを用いて、微細な酸化鉄粒子を合成した。ゼラチンは、生体から取り出せるポリペプチドであって、その分子内および分子間水素結合により様々な2次構造を取ることが知られており、今後、様々な応用が期待される高分子である。

具体的には、塩化鉄(III)を原料とし、保護高分子たるゼラチンの存在下、 50°C において水素化ホウ素ナトリウムをシリンジを用いて滴下して、ナノ粒子分散液を調製した。得られたナノ粒子についてカーボンコートした銅グリッドの上に分散液を滴下して乾燥したサンプルを透過型電子顕微鏡(加速電圧 200 kV)で観察した。図1に得られたTEM写真を、また、図2にその写真から観察した粒子径分布を示す。得られたナノ粒子の形は球形であって、その平均粒子径は、 2.8 nm で、特に大小どちらかに分布が片寄ることもなく、均一な粒子径分布を持っている。また、このナノ粒子を基板上に分散・塗布し、その表面をAFM観察したところ、図3のようにその高さは平均粒子径よりも大幅に高く、 18 nm に達していた。このことから、非常に厚い有機分子シェルがナノ粒子をコアにして包み込んでいることが分かる。こうしたナノ粒子は生体親和性が極めて高いことが十分に期待される。また、X線回折測定により、こ

のナノ粒子は鉄の酸化物であり、主にマグネタイトであることが分かった。これは、水素化ホウ素ナトリウムのもつ還元的雰囲気と、添加した溶液のアルカリ性によって生成したものであると考えられる。こうして得られた酸化鉄ナノ粒子はSQUID測定の結果、超常磁性であることが示された。実際、得られたナノ粒子は粉末状態において図4の通り、希土類磁石に反応し、サンプル瓶内において、磁石に着くことが分かった。一方、同様の手法でナノ粒子を低温(20°C)で合成したところ、磁石には反応しなかった。これはゼラチンが分子状とはならず、上手く保護できずにいるのも一つの原因かと考えられる。今後はこれらの磁性ナノ粒子を利用したバイオセンシングなどへの応用展開を図っていくと同時に、生体内での動きなどの検証を行っていきたい。

また、従前より研究協力者らは、ポリペプチドの末端に硫黄部位を持つ分子を合成し、ナノ粒子の保護剤として用いていた。例えば、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)は、(以下Lipo-PBLGと略す)を使用して金ナノ粒子を合成したところ、Lipo-PBLGは優れた保護能を示し、ナノ粒子上に単分子膜を形成したと思われる。このようにポリペプチドはそれ自体をナノ粒子の保護高分子として利用できるほか、金属配位部位を持たせて、単分子膜様に保護することも可能であることが分かった(図5)。

②の生体適合性のよい有機酸として本研究ではクエン酸を用いて比較的粒子径の大きなナノ粒子の調製を行った。高濃度の硝酸銀溶液にクエン酸を加えて煮沸することでナノ粒子を得ることができた。得られた分散液は透明ではなく懸濁しており、部分的に凝集・沈殿も見られるが、沈殿部以外をもって、処理をした。

処理は、粒子径よりも大きなフィルターを通すことによってナノ粒子を得る手法である。金や銀ナノ粒子は比較的粒子径が大きくなると、平板状やロッド状の粒子など異形状の粒子が多く見られるようになることが分かっている。本手法によって調製された銀ナノ粒子の中にも、必ずしも球形ではなく、異方性の高い粒子が散見されたので、ろ過によってナノ粒子の精製を行うこととした。

添加したクエン酸を除去するには、限外ろ過膜(また、限外ろ過用中空糸膜)を通してイオンを取り除

く方法が有効であることは既に分かっているが、大きな粒子の形状を整える手法は不明であった。当初、ナノ粒子に不要なコンタミネーションを入れない目的で、水溶性物質であれば、あまり溶解物に影響されないフィルターとして、親水化したPTFEを用いてろ過をした。ポアサイズは0.2 ミクロンのものを用いた。その結果、得られた粒子は約70 nmの粒子径をもっているが、異方性のある粒子が多く見出された。その結果については、フィルターのポアの形状が原因の一つであると考えられる。つまり、親水化したPTFEのポアは円状のものでないことが原因と考えられる。(図6)

そのため、円状のポアだけを有する0.4 ミクロンのフィルターを用いてろ過した。その結果、得られた銀ナノ粒子は図7の通り、球状のものが多かった。

今後、クエン酸還元大型銀ナノ粒子を用いて生体内に導入した後、その粒子の存在を追跡し、可動状況を知ると共に、リスク評価を行って行きたい。最初の試験として、1匹/Lの金魚水槽の中に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6日暴露したところ、腸壁に銀ナノ粒子がついている状態が観察された(図7、図8)。今後、さらに詳細な暴露試験を行う予定である。

さらに、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の作製を目指した。製造法としては、ピュアなナノ粒子を得るための製造法として最適な、インゴット(板)からのレーザーアブレーション法を利用した。このとき、レーザーエネルギーが拡散するため、比較的強度の高いエネルギーが必要である。

こうして得られた金・白金ナノ粒子は安定で分散状態を保持していたが、白金は数日で沈殿となってしまうことが分かり、金ナノ粒子は非常に安定に保持されていた。こうした無機表面がむき出しの場合にどういった表面挙動が起きるのか、体内動態が生じるのかについても非常に興味深いと思われる。

(倫理面への配慮)

今回、ヒトへ関与した実験は行っておりません。動物実験(金魚)も最小限の負担で実験できるように致しております。

D. 考察

本研究では生体とのかかわりを検討するに値する無機・金属ナノ粒子の創製を目指した。その結果、いずれの方法においても安定に分散されたナノ粒子を作ることができ、その粒子径も様々に制御できる可能性を見出した。

生体と無機ナノ粒子のかかわりを検討することは、ナノトキシコロジーの分野に貢献するだけでなく、有能で環境にもやさしく、毒性も少ないと考えられる新材料設計の強い指針を得ることになる。今後、今回得られた材料のみならず、さらなる検討を深めていく必要があると考えられる。

E. 結論

生体と無機ナノ粒子のかかわりに関する研究を行うにあたり、原料粒子の作製に重点を置いた。様々な表面を有したナノ粒子を調製することが可能であり、また、その大きさも広い範囲で制御できることが明らかとなってきた。

ナノ粒子のどの部分に生体とのかかわりが大きく現われるかはまだこれからの検討を待つべきではあるが、①ナノ粒子表面の形状、状態と②ナノ粒子の大きさと形の2つが大きくかわることは容易に予想できるはずである。本研究補助者は、応用の観点からこの2つの制御にこれまで長く従事してきた。その技術を活かし、本事業に深く広くかかわっていきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tetsu Yonezawa, Nomura, Masayoshi Tanaka, Takatoshi Kinoshita, "Preparation and Characterization of Polypeptide-stabilized Gold Nanoparticles", *J. Nanosci. Nanotech.*, **6(6)**, 1649-1654 (2006).
2. Yoshinori Yamanoi, Naoto Shirahata, Tetsu Yonezawa, Nao Terasaki, Noritaka Yamamoto, Yoshitaka Matsui, Kazuyuki Nishio, Hideki Masuda, Yuichi Ikuhara, and Hiroshi Nishihara, "Detailed Structural Examinations of Covalently Immobilized Gold Nanoparticles onto Hydrogen-terminated Silicon Surface", *Chem. Eur. J.*, **12(1)**, 314-323 (2006).
3. Nao Terasaki, Noritaka Yamamoto, Kaoru Tamada, Mineyuki Hattori, Takashi Hiraga, Akihiko Tohri, Ikutaro Sato, Isao Enami, Yasunori Inoue, Yoshinori Yamanoi, Tetsu Yonezawa, Masaki Murata, Hiroshi Nishihara, Satoshi Yoneyama, Makoto Minakata, Tsutomu Ohmori, Makoto Sakai and Masaaki Fujii, "Bio-photosensor: Cyanobacterial Photosystem I