

材料のナノサイジングと生体反応性



亘 理 文 夫*

JJSB

Nanosizing of materials and tissue reaction

The development of DDS is expected for the administration of anticancer agent and gene transfection. On the other hand, biocompatible Ti causes inflammation as abraded fine particles and asbestos, a kind of clay minerals, induces mesothelioma after a long-term, large quantity of exposure. The effect originating from fine particles contributes to these phenomena, apart from the material properties of either toxicity or biocompatibility. It is necessary to establish the proper understanding and principle on the biological reactivity of micro/nanoparticles in advance to develop the biomedical application for human beings. Biocompatibility in bulk is material-dependent based on the chemical properties due to the ionic dissolution. In addition to this, non-specific cytotoxicity arising from the physical size and shape effect is pronounced in the micro/nano scale. Nanoparticles might be the objects whose existence has not been assumed by living body defense system. They have both sides of high functional nature and stimulus, and their control is important. The biotechnology application of carbon nanotubes is also described.

DDSは抗がん剤投与や遺伝子導入に開発が期待されている。一方、生体親和性にすぐれるチタンは、摩耗粉では炎症を引き起こし、粘土鉱物の一種アスベストは長期大量に被曝すると中皮腫を発症する。こうした現象にはたんに材質が毒性か生体親和性かという特性とは別に、微粒子に起因する効果が寄与していると考えられる。

ナノテクノロジーの人体へのバイオ応用には予めマイクロ/ナノ微粒子の生体反応性に関する適切な理解と指針が必要である。マクロでの生体適合性はイオン溶出性などの化学的特性に基づく材質に依存するが、マイクロ/ナノではこれに加え、微粒子のサイズ、形状に依存する物理的効果に基づく刺激性も顕在化する。ナノ微粒子は生体防御機構が想定していない対象である可能性があり、高機能性と刺激性の両面を併せ持ち、その制御が重要である。

本稿では、これらについて述べるとともに、カーボンナノチューブのバイオ応用性についても述べる。

Fumio Watari*

Key words: 微粒子, 生体適合性, ナノトキシコロジー, 生体防御機構, カーボンナノチューブ

材料のナノサイジングと生体反応性

1900年にマックス・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)。20世紀後半から今日の21世紀の世界は、まさにIC、レーザーなどを生み出し

た量子力学のうえに社会がなりたっているといっても過言ではない。材料もナノサイズになると、表面に占める原子数の割合が体積内部の原子数と同程度になり、また、量子効果の影響によるバンド構造の変化もあらわれはじめ、新たな特性が発現する。

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。ナノサイジングによる材料自体の特性変化はもちろん影響するが、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あらわれてくるのである。

Tiは耐食性も高く、金属中、最も生体親和性にすぐれ^{1,2)}、インプラントに使われているが、耐摩耗性に劣り^{3,4)}、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。

* Biomedical, Dental Materials and Engineering, Department of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体理工学教室
 [略歴] 1971年 東京大学工学部金属工学科卒業。1976年 東京大学大学院工学系研究科修了。1976年 ベルギー国立原子力研究所ならびにアントワープ大学材料学科学研究員。1978年 アリゾナ州立大学物理学科学研究員。1982年 東北大学科学計測研究所助手。1984年 東京医科歯科大学歯学部歯科理工学第一講座助手。1993年 北海道大学歯学部歯科理工学講座教授。2000年 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座教授、現在に至る。

最近改めて問題が顕在化したアスベストは材質的には粘土鉱物の一種であり、本来毒性のあるものではないが、長期大量に吸引曝露すると、約30年経て中皮腫を発症するに至る。こうした現象には、たんに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ものと考えられる。

カーボンナノチューブは電子エミッター、燃料電池など、電子、化学分野で注目されているが、バイオ応用に注目した研究はほとんどなされていない。欧米からは肺がん誘発性のあるアスベストとの形状の類似性による連想から、重大な為害性があるという論調が出されている。

抗がん剤は投与すると、しばしばがん患部に到達する前に健常組織に吸収され、体力を損う副作用として働いてしまう。DDS(ドラッグデリバリーシステム)はこうした欠点を回避し、特異的に作用する結合基を付けて血流に乗せて移送し、がん患部にのみ薬剤を投与しようとする代表的なナノパーティクルのバイオ応用例である。その実現のためには生体組織との相互作用の情報が必須の前提となる。

こうした材料の微細化に伴う生体反応挙動は、今後の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が、いまだ未知な部分が多い。筆者らは他に先駆け研究を進めてきており、本稿ではそのデータに基づき、現象の全体を俯瞰することにしてしよう。

材料と生体反応(マクロ, *in vivo*)

微粒子の生体反応をみる前に、まず通常の場合、すなわちマクロサイズの材料に対する組織反応性をみておこう。

はじめに、各種金属をラット皮下に1週埋入したときの周囲軟組織を示す(図2)。Niでは組織が壊死し、強い為害作用を示すが、Tiではインプラントを被包化する線維性結合組織が形成されており、生体親和性に富む材料の典型的な反応である。Feは溶出は大きいが為害性は小さく、すでに被包化している。

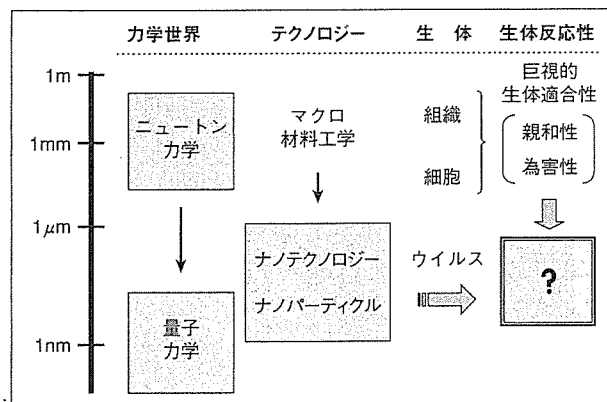


図1 ナノテクノロジーの力学世界、生体との関係、および材料のマクロ/ナノサイジングと生体反応性の関連

このFeの反応はTiと類似しているが、より詳細にみると細胞核の密度、染色濃度はFeのほうがTiよりも高く、相対的に生体がより強く反応していることを示している。純Tiのほうが長期的には生体親和性がより良好と予想される。Agは、いまだ線維性結合組織は形成途中である。各材料の生体適合性の程度に敏感に反応し、材質に依存して組織反応性が変化していることがわかる⁵⁾。

微粒子の生体反応性(*in vitro*)

つぎに、ミクロ/ナノ微粒子の生体反応性を *in vitro* 細胞機能性試験の結果で示す。サイズの異なるTi微粒子を混和した細胞培養用 Hanks 溶液(HBSS)にヒト好中球を添加したときの細胞生存率を図3に示す。好中球は、白血球の約50%を占める5~10 μmと比較的小さな顆粒球で、生体内の異物に対して非特異的に反応する貪食細胞の一種である。微粒子サイズが150 μmから0.5 μmへ順次小さくなるにつれ、生存率は減少している⁶⁾。

このとき、細胞が破壊されたときに細胞膜から放出される乳酸脱水素酵素(LDH)の活性値は細胞破壊または死滅率の一つの指標であるが、微粒子サイズが小さくなると増加し、細胞生存率と非常によい逆相関を示し、ともに微粒子サイズに依存している。

また、ヒト好中球からの活性酸素産生量を測定すると、同様に粒径が小さくなるとともに産生量が増加し、典型的なサイズ依存性を示した。Ti微粒子サ

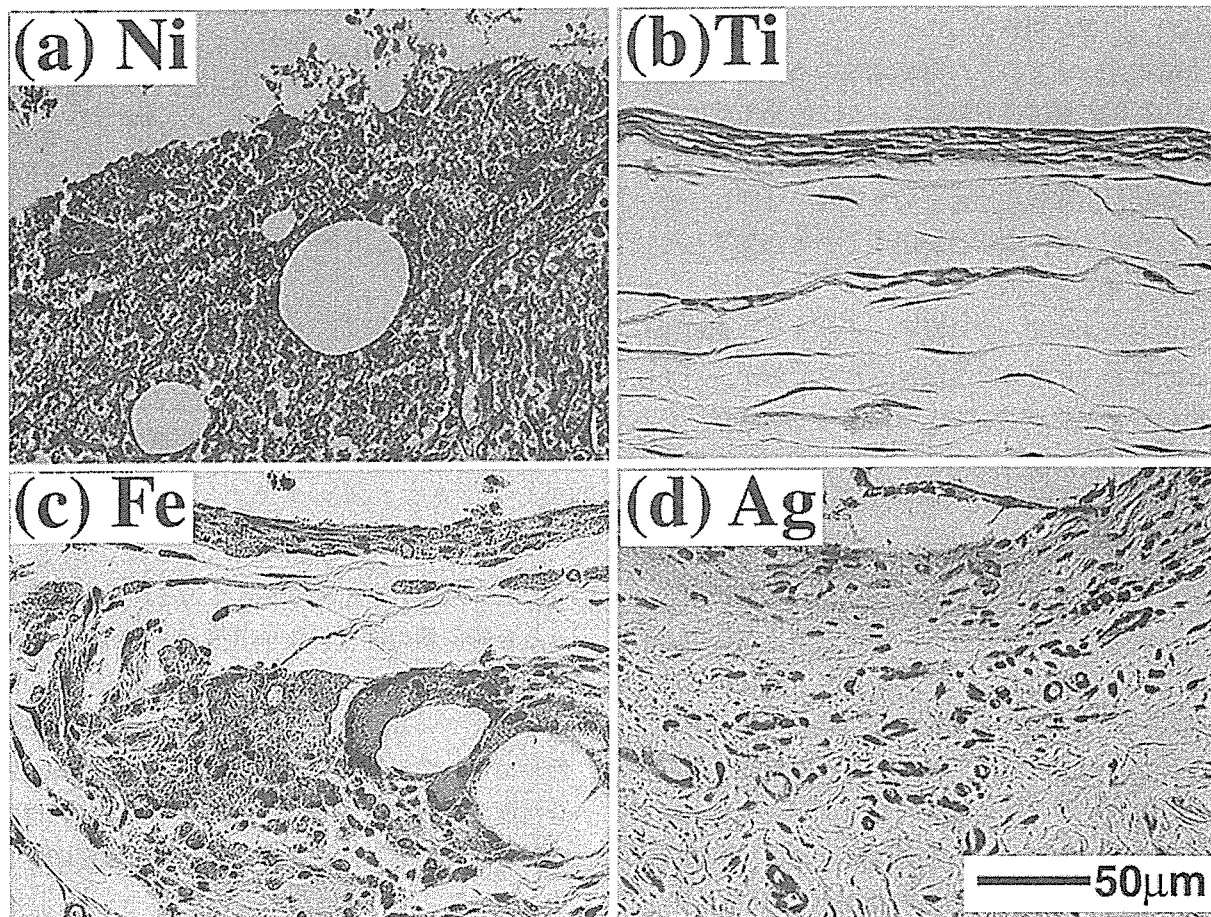


図2 各種金属に対する軟組織の反応(ラット皮下1週埋入後) (Watari F et al., 2004)⁵⁾

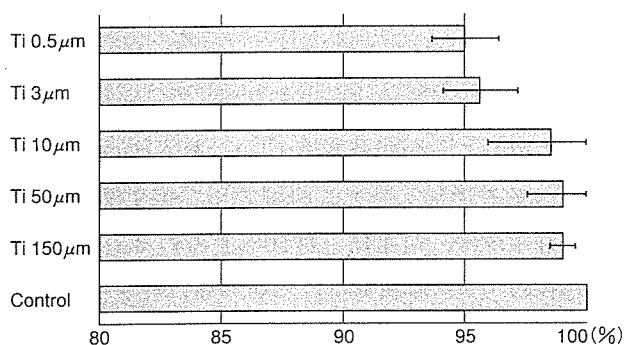


図3 細胞生存率のTi微粒子サイズ依存性 (Tamura K et al., 2002)⁶⁾

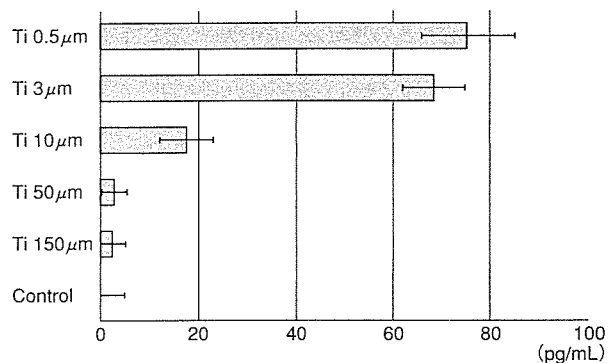


図4 ヒト好中球からのサイトカインIL-1β産生のTi微粒子サイズ依存性 (Tamura K et al., 2002)⁶⁾

イズが小さいほど細胞刺激性が増加し、細胞が異物とみなして反応することがわかる。

図4はヒト好中球からのサイトカインIL-1βの放出を示したものである。サイトカインは細胞から放出される比較的低分子量の蛋白質で、細胞間のシグナル伝達、新たな細胞の分化・誘導などの機能を果たしている。サイトカインは多数存在するが、IL-1β

は炎症性反応の程度を示す最も代表的な指標の一つである。Ti微粒子サイズが減少するとともに、放出量は10µm付近から急激に増加しており、細胞刺激性を示すことがわかる⁶⁾。

これらの液中での好中球の形態を観察すると、3µm以下の粒子でのみ好中球による貪食像が観察さ

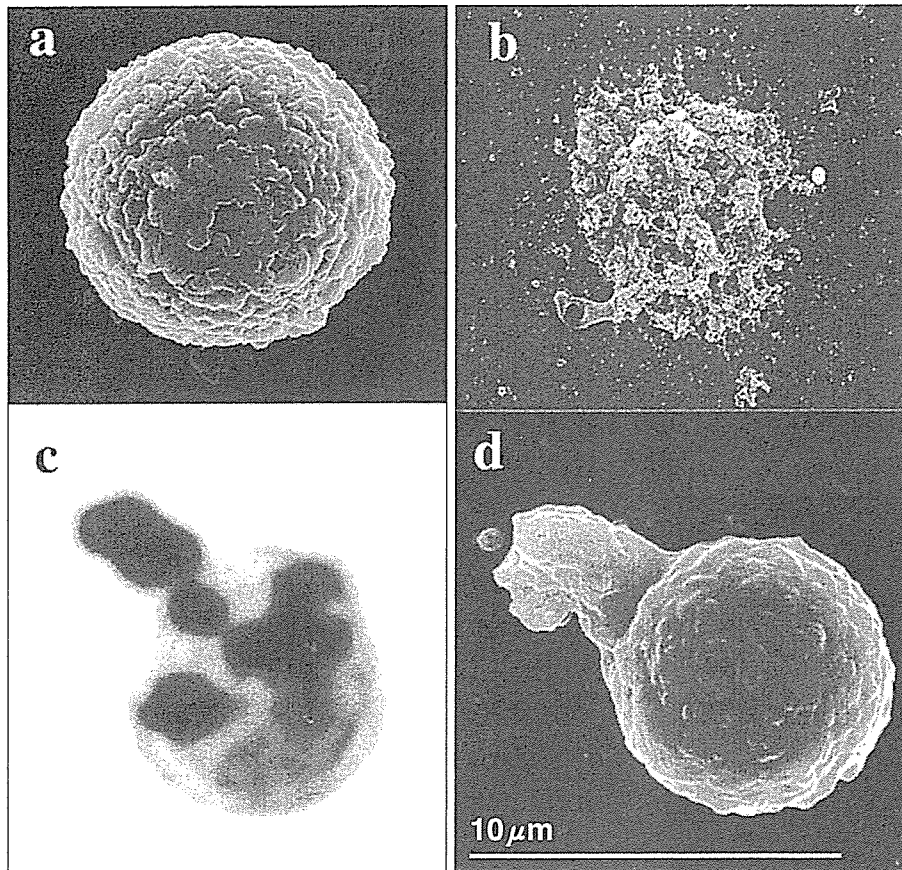


図5
各種微粒子に対するヒト好中球の反応
(Tamura K et al., 2002)⁶⁾
a : コントロール (SEM 像)
b : Ni (0.5 μm) (SEM 像)
c : TiO₂ (0.3 μm) (光顕像)
d : Ti (0.5 μm) (SEM 像)

れた。まず図5aは、HBSS溶液中での通常の好中球のSEM像(コントロール)である。そして図5c, dは、0.3 μm TiO₂, 0.5 μm Ti 粒子混和液中で観察された、好中球が偽足を伸ばし貪食しようとしている様子をとらえた光学顕微鏡像とSEM像である⁶⁾。この好中球をEDS(energy-dispersive spectrometer)元素分析すると、Tiが検出され、好中球によるTi粒子の貪食が確認される。図5bはNi微粒子(0.5 μm)について同様な実験を行ったときの好中球のSEM像で、Niの強い為害性のために細胞は破壊されている。好中球の大きさは約5~10 μmであり、3 μm粒子は貪食可能であるが、10 μm以上の粒子では困難である。微粒子サイズが細胞以下になり、貪食を誘発するようになると刺激性は一段と昂進する。

以上の条件下で、Ti微粒子からの溶出量のICP元素分析を行うと検出限界値以下であり、イオン溶出は無視できると考えられる。すなわち、Ti微粒子が示した刺激性・為害性は化学的イオン溶出がなくても発生するのであり、微粒子という物理的サイズ・

形状に由来するものであることがわかる⁷⁾。また、このような現象は、溶解度などの化学的性質は異なるが、図2のように比較的良好な生体適合性を示すFeでも同様にみられる。すなわち、Ti, Feなどの金属、TiO₂, カーボンナノチューブなどのセラミックス、ポリ乳酸などの高分子のいずれでもbioactive, bioinertな特性を有する材料共通に認められ、材料に非特異的に起こる効果である。

さて、bioactive, bioinert材料の*in vitro*細胞毒性試験における、こうした微粒子に起因する毒性は、endotoxinなどの細菌内毒素にくらべれば、絶対値が1/1,000~1/1万以下とはるかに小さく⁸⁾、その刺激性は急性の強いものではなく、通常の日常生活ではあまり問題ないものと思われる。しかし、*in vivo*組織埋入試験ではこのとき、組織内では貪食を誘発し、金属微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ことが観察される。こうした微粒子が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

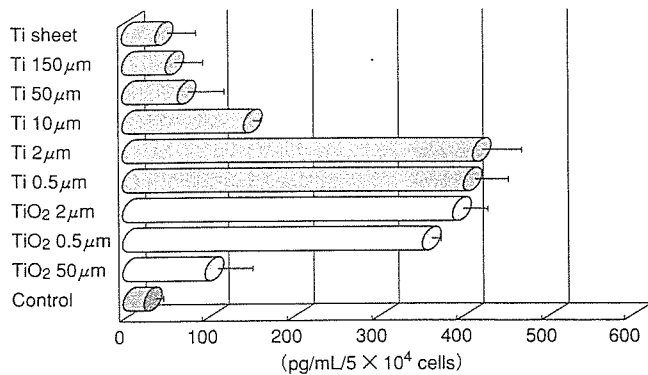


図6 ヒト好中球からのサイトカインTNF- α 産生の微粒子サイズ依存性(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾

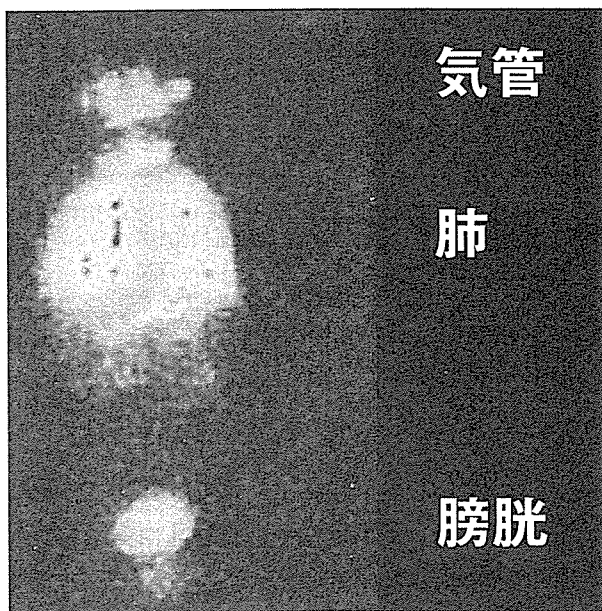


図7 ナノトキシコロジー：30nm TiO₂粒子の強制曝露試験後のXSAMマッピングによるラット体内の全身Ti元素分布像(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾
ナノパーティクルは呼吸器系を通じて体内に取り込まれ、全身に拡散する。

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、注意が必要である。一方、もともと為害性のある材料では微細化による比表面積増大効果のため、後述のNi微粒子のように為害性は著しく強くなる。

微粒子がサブミクロンよりもさらに小さくなったときのヒト好中球からのサイトカインTNF- α 産生の微粒子サイズ依存性を図6に示す。TNF- α も代表的な炎症性サイトカインの一種で、特に細胞の貪食作用に密接に関連している。金属Tiは0.5 μ m以下になると容易に酸化し、微粒子として大気中下で扱



図8 0.5 μ m Niをラット皮下に1年埋入後の腫瘍生成(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾

のは困難で、さらに小さいものにはTiO₂を用いている。物理的サイズ効果の材料非依存性を反映し、その絶対値レベルは金属Tiとあまり変わらない。刺激性はマイクロメートル前後～0.5 μ m付近を頂点として200 nm付近以下になるとむしろ低下し、50 nm TiO₂ではかなり低いレベルになる。また、長さを揃えたカーボンナノチューブを用いて*in vivo*埋入試験を行うと⁹⁾、1 μ mや600 nmよりも、長さの短い200 nmのほうが早く貪食され、細胞内のライソゾームに取り込まれ、起炎性も低いことが観察される¹⁰⁾。

ナノトキシコロジー

微粒子になり、材料のサイズが細胞と同程度(約10 μ m)になると刺激性が昂進し、Tiのような生体親和性材料でも炎症を誘発するが、さらに小さくなると、むしろ刺激性は低下する。このことはナノテクノロジーを適用するには一見都合がよさそうにみえる。しかし、目的によっては意図に反して生体防御機構がもはや十分に働かず、異物の侵入を許してしまうということにも通ずる。

図7は30 nm TiO₂粒子のラットへの強制曝露試験後の体内全身のX線走査型分析顕微鏡(XSAM)^{11)~14)}によるTi元素マッピング像である。化粧品に使われている30 nmのTiO₂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、肺から血中に取り込まれ、全身に拡散していることがわかる。微粒子材質、大きさに

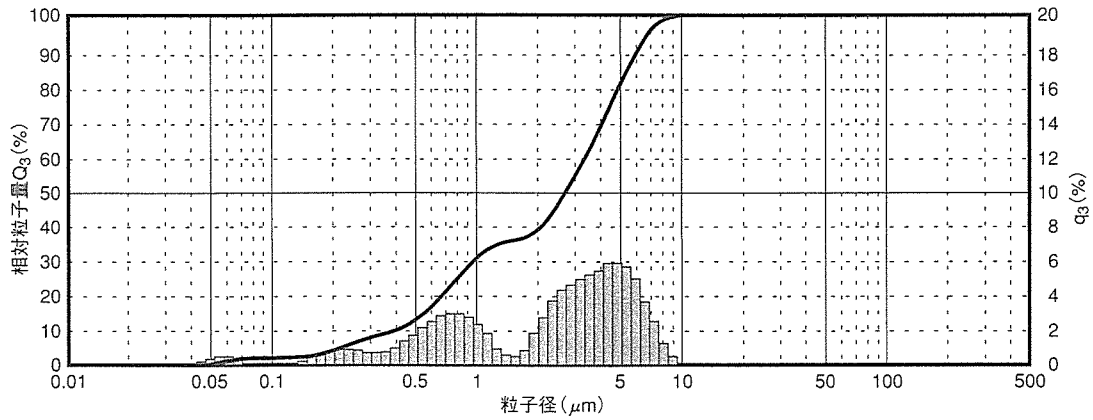


図9 摩耗粉の粒度分布(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾
Tiを歯科用エアタービンで研磨した一例

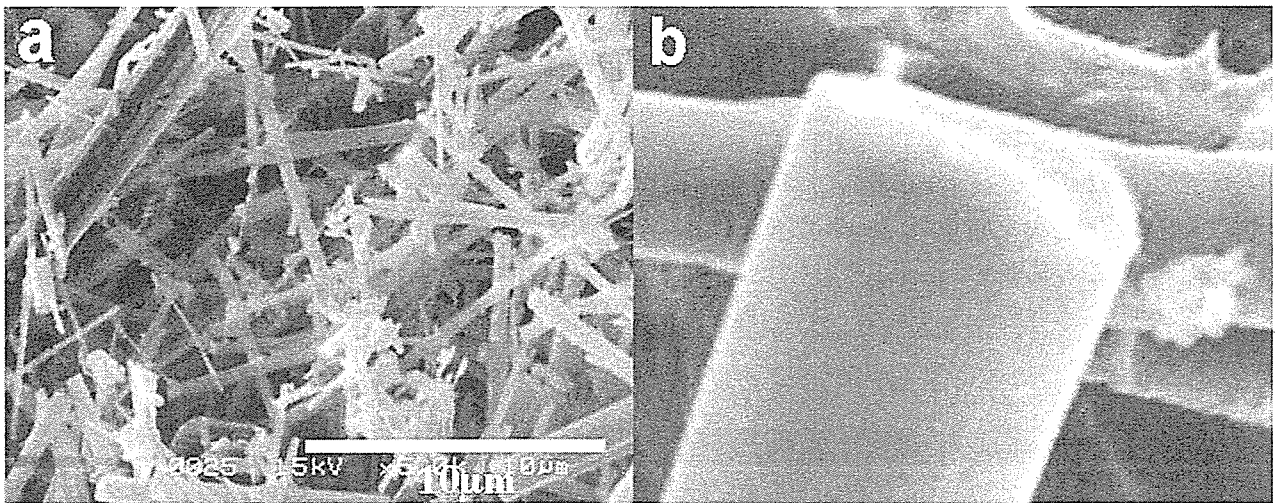


図10 アスベスト(クロシドライト)(a)とアスベスト代替品(b)のSEM像

よって細胞死を導きその場に蓄積するものと、血流にのって他臓器に到達蓄積するものがある。これらは意図せずして血中を回流する効果である。

図8は0.5 μm Niをラット皮下に1年埋入後の結果で、腫瘍が生成している。本来、マクロでアレルギー性などの為害性を示すNiは、マイクロ/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した。これは、同一重量でも微粒子になると著しく表面積が増大する比表面積効果の一例である。

図9は摩耗粉の粒度分布の一例で、Tiを歯科用エアタービンで研磨したときの粒度分布である。最も大きな分布ピークが5 μm付近に、ついで0.8 μm、さらに低くなって0.2 μm, 0.07 μm付近とつづいており、上述のようにいずれも生体組織との反応が生

起しうる範囲にあり、こうした観点からはやや微妙なサイズである。

形状効果—アスベスト

アスベストの発がん性はよく知られているが、アスベスト自体は粘土鉱物の一種であって材質に為害性があるわけではない。粉末形状が針状結晶であるために生ずる物理的の微粒子為害性効果が第一の要因である。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、発がん性が高いクロシドライト、アモサイトでは図10, 11のように顕著な針状形状を示し、EDS元素分析を行うと通常のシリケー

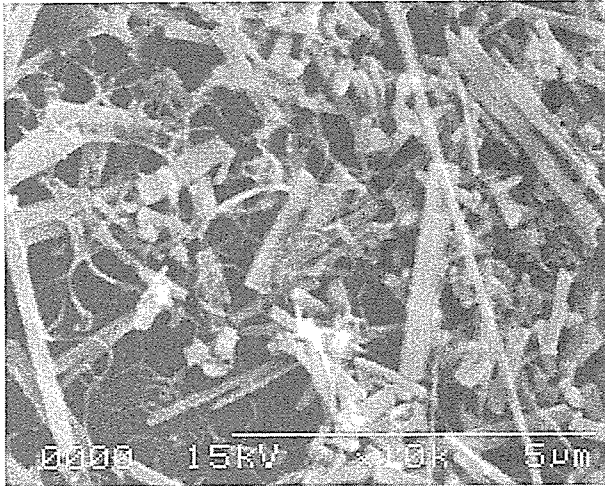


図11 アスベスト(クロシドライト)の分散性と
カーボンナノチューブの凝集性

トの成分のほかにも多量の Fe を特徴的に含有している。

クロシドライトとアスベスト代替品(アルミナ)を同倍率で比較したものを図 10 に示す。微粒子は約 10 μm 以下になると気管支を通過するが、代替品では大きさの点からも呼吸器系に侵入しにくい形態になっている。

アスベストとカーボンナノチューブ

カーボンナノチューブは主として電子エミッター、燃料電池など、電子、化学分野で注目されているが、バイオ応用に注目した研究はほとんどなされていない。欧米からは肺がん誘発性のあるアスベストとの形状の類似性による連想から、重大な為害性があるという論調が出されてきている¹⁵⁾。

図 11 はアスベスト(クロシドライト)とカーボンナノチューブを混合し水中攪拌後、乾燥した状態の SEM 像である。針状のクロシドライトは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。この図 11 は乾燥時に集積した部分で、針状のクロシドライトに細いカーボンナノチューブが絡まるように凝集している。カーボンナノチューブ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てほとんど湾曲することがないのに対し、屈曲性に富み、疎水性で凝集しやすいことがわかる。

筆者らは、カーボンナノチューブに関しても細胞機能性試験、動物埋入試験を行い、上述した bioinert 材料一般に起こる程度の微粒子刺激性は有するものの、短・中期的には特異的な生体為害性は認めず、むしろ生体材料として有利な細胞・組織に対する特徴的な種々の親和性を多数見いだした。バイオ用カーボンナノチューブの開発^{16~21)}、糖鎖、アパタイトによる表面修飾、細胞培養・組織再生用スカフォールドなどのバイオ応用、および有害汚染物質の吸着捕捉材^{22, 23)}などの環境対策への応用開発を進めてきている²⁴⁾。

図 12 に人工体液に浸漬後、カーボンナノチューブ上に析出したアパタイトの SEM 像を示す²⁵⁾。針状または板状ナノアパタイト微結晶が、カーボンナノチューブを基点に放射状に成長している。溶液と基材の条件に依存して析出や結晶性、形態が変化する²⁶⁾。こうした現象は、アパタイトのいわゆるバイオミメティックコーティングとして、擬似体液に Ti を浸漬すると表面にリン酸カルシウムが析出することが知られているが、カーボンナノチューブでもアパタイトによる表面修飾が可能であった。

図 13 はヒト歯牙をリン酸でエッチングしたあとの象牙質で、脱灰^{27, 28)}により残留したコラーゲン繊維が象牙細管内を含め一面にみられ、その上にカーボンナノチューブが吸着している様子が観察される。疎水性のカーボンナノチューブはコラーゲンに吸着しやすい特性を示す^{29, 30)}。

図 14 は骨芽細胞様細胞 Saos2 を培養したときの細胞末端の SEM 像で、スカフォールドとしてポリカーボネート膜(図 14a)、カーボンナノチューブ(図 14b)を用いた場合を比較したものである。カーボンナノチューブ上で培養細胞は高い増殖・伸展性を示し、末端から多数の微細な細胞突起を遠方にまで張り出し強く付着する。同素体であるグラファイトでは細胞がきわめて付着しにくく、その血球に対する抗血栓性を活かして人工心臓弁材料として使用されているが、カーボンナノチューブ上では細胞はきわめて高い接着性と良好な増殖性を示す。

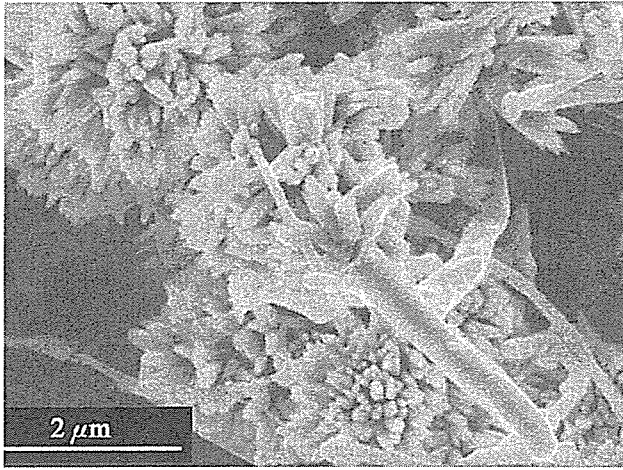


図12 人工体液中でカーボンナノチューブ上に析出したアパタイト(Akasaka T et al., 2005²⁵⁾; Akasaka T et al., 2005²⁶⁾)

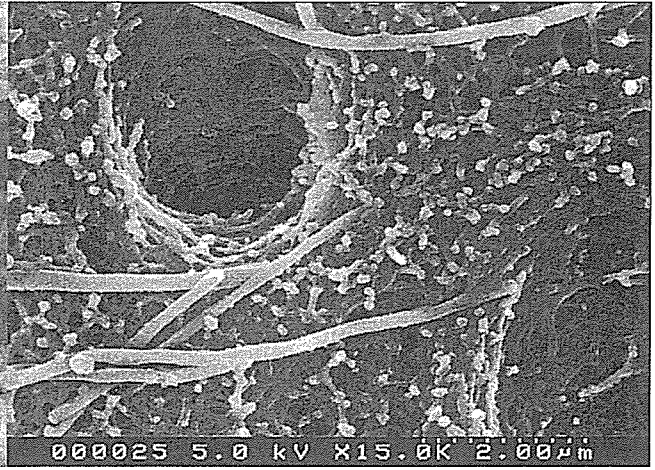


図13 脱灰象牙質表面のコラーゲン線維に吸着するカーボンナノチューブ(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾

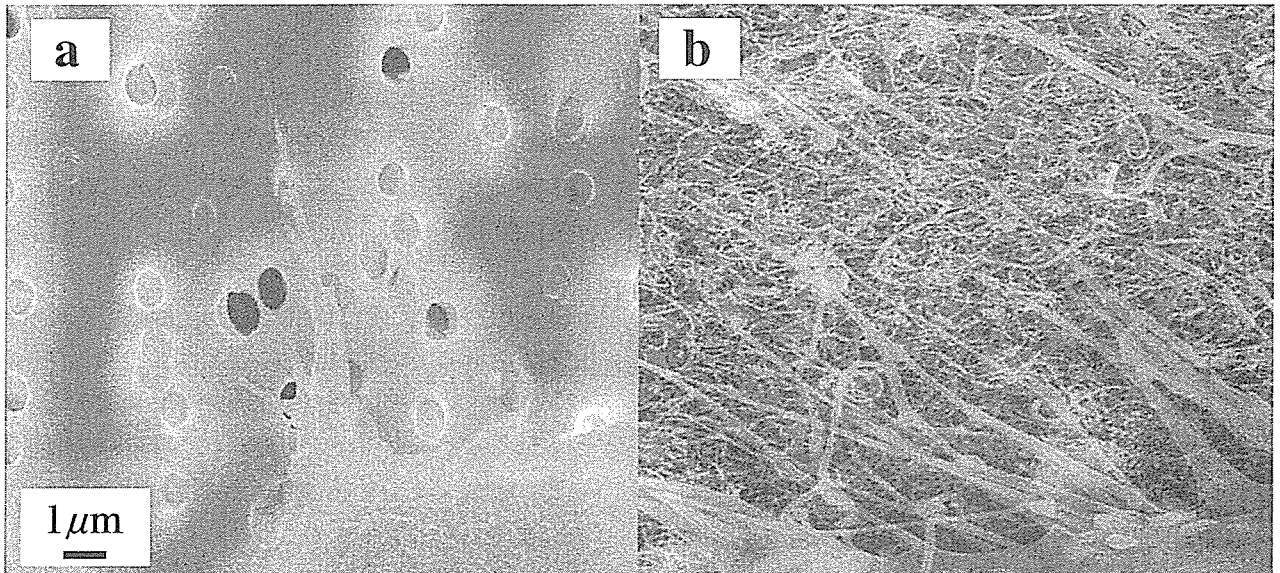


図14 ポリカーボネート膜(a), カーボンナノチューブ(b)の各スカフォールド上で培養した細胞末端のSEM像(Aoki N et al., 2006²⁹⁾; Aoki N et al., 2005³⁰⁾)
カーボンナノチューブ上で培養細胞は高い増殖・伸展性を示し, 末端から多数の細胞突起を張り出し強く付着する。

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ことから, 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, 50 nm 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が転換

し, 新たな機能を発現する。

図15はナノアパタイトー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³¹⁾。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ている。そして, 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っており, 結果として, ナノアパ

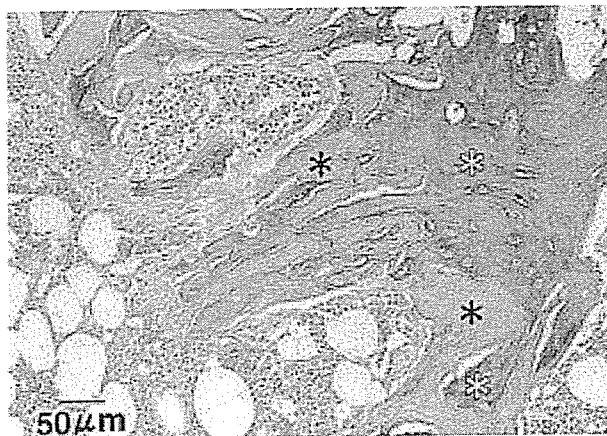


図15 ナノアパタイト-コラーゲンコンポジットの骨置換性(Yokoyama A et al., 2005)³¹⁾
 ナノコンポジット部(黒*)の吸収と新生骨形成(白*)が不可分に生じ、結果として骨置換性が達成されている。

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あいまって骨置換がさらに容易に進行する³²⁾。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把握していると、よく理解できる。

結 言

ナノ/マイクロサイジングの効果としては通常、①比表面積効果で論じられることが多い。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ことになる。たとえば、図8のNiの為害性昂進など、イオン溶出が関連する効果はこれに該当するだろう。また、②表面原子の占める割合が無視しえなくなり物性が変化する、さらに、1 nmのオーダーになれば量子効果によりバンド構造が変化し電子物性が変化するという、材料特性の変化もある。また、③ある種の触媒にみられるような特異な活性点形成による反応活性化もこれに含まれるだろう。

しかし、生体反応性に及ぼす影響はそれに留まらない。こうした材料自体に由来する効果のみならず、材料と細胞・組織との相対的な関係に起因する効果も出現するのである。④サイズ効果、⑤形状効果などがこれに当たる。これらは化学的性質に基づく

材質に由来する効果、すなわち、材料の特性とは独立にあらわれる物理的効果である。この効果はマクロサイズでは問題になることはなく無視できると、マイクロ/ナノサイジングしても多くの場合、材料はイオン溶出性であり、比表面積効果が大きいために、この効果は認識しにくいことが多い。たとえば、Ni微粒子も図4のような炎症性サイトカインの産生に関してサイズ依存性を示すが、その挙動はTiやFeとは異なっている。しかし、bioactive, bioinert材料ではイオン溶出性の化学的効果は弱いか、ほとんど無視しうるために、マクロサイズでは刺激性が認められなかったものが、マイクロ/ナノサイジングとともに刺激性が増大する物理的効果が単独で作用し、純粋なサイズ効果が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、およそ100 μm以上のTi,あるいはbioactive, bioinert材料の微粒子は、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、50 μm以下では刺激性が昂進し、特に10 μm以下になると貪食作用を誘発し、長期間炎症反応を引き起こす³³⁾。このような現象は金属、セラミックス、ポリマーのいずれでもbioactive, bioinertな材料に同様に認められ、材料に非特異的に起こる効果である。そのメカニズムは微粒子と細胞・組織とのサイズの相対的な関係に由来するものである。すなわち、マクロサイズの生体適合性には通常、溶解イオンとして発現する材質依存的な化学的効果が支配的であるが、マイクロ～ナノになるとbioactive, bioinert材料でも、材質非依存的に微粒子の物理的サイズ効果による細胞毒性が顕現化する。

Bioactive, bioinert材料の場合、その為害性の程度は*in vitro* 試験によれば細菌内毒素にくらべると1/1,000～1/1万以下と低く、刺激性は急性の強いものではなく、通常の日常生活ではあまり問題ないものと思われる。しかし、*in vivo*の組織内では貪食を誘発し、金属微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。カーボンナノチューブは、その形態、動態、挙動がアスベストとはやや異なると考えられる。

また、図7の30 nmのTiO₂の強制曝露試験のように、微粒子サイズが50 nm以下になると生体が異物と認識・処理できず、呼吸器系・消化器系を通じて直接リンパ液や血液に取り込まれ全身に拡散し、他臓器に影響を及ぼす可能性がある。ナノ微粒子は生体がもともと想定していなかった対象である可能性がある。

この体内侵入の経路は薬剤投与から生体側摂取に至る経路とまったく同じである。すなわち、材料のナノサイジングにより化学反応は昂進するから、人間の意向とマッチすれば高機能性として働くのであり、一方、意図せずして為害性に働くナノトキシコロジーとしてあらわれたとしても現象の本質は同じであり、けっして不思議ではない。

閑話休題、ナノトキシコロジーという用語はナノテクノロジーに対応し、わかりやすい。しかし、微粒子に特有な生体反応特性はマイクロメートル付近から開始し、さらに長期的な組織埋入試験では100 μm付近からあらわれる。人為的な単位に合わせたこの用語は生体に由来する現象の本質に即したのではなく、この意味で、微粒子特有の効果という観点からは必ずしも正確ではない。

筆者らは2000年以来、世界に先駆けて研究を進め、2004年のナノトキシコロジーという用語の出現、2005年のアスベスト問題の再燃以前から、ナノテクノロジーのバイオ応用、とりわけ人体へのバイオ応用には予め生体反応性を調べ、ナノトキシコロジー/安全性条件³⁴⁾を把握したうえで、その指針のもとに推進すべきであると繰り返し提起してきたが、必ずしも認知されていない。その大きな理由の一つに、材料と生体の両者に精通していることが必要ということがある。材料あるいは医学・生物学の専門家の一方のみの視点からではその意義が充分理解されずに終わることが多い。また、ナノテクノロジーの発展に有害と捉えられる傾向もある。

しかし、日本がこの問題の意義を理解せず忌避している間に、必ずしもデータが出て先行しているわけではない欧米が積極的に、世界標準やナノテクノロジーの規制といった観点から国際的な枠組みをまず構築し、ヘゲモニーを握りつつあり、日本は後発的に参加し後塵を拝する結果になろうとしている。

日本の科学の展開に典型的な推移である。ナノテクノロジーの安全性/危険性評価に関する研究会では国内外ともデータに基づかないままに論じられたり、誇張して取り上げられたりすることが多い。また、各材料について安全/危険と一面的に断定されることも多いが、マクロのときは異なり、ナノ微粒子の場合は高機能性と刺激性の両面を併せ持つのであり、条件とコントロールしだいでどちらかの面が強くと出ると理解したほうがよい。

生体反応性への材料のナノサイジング効果の解明と制御はナノテクノロジーの進展にとって、材料学的にも医学的見地からも新たな、大きな発展につながる、本質的、かつ未知であるが、それだけに魅力的な学問分野である。また、人間の健康と環境に影響を及ぼす問題でもある。今後の新たな知見と開拓が期待される。

本稿の研究結果の一部は厚生労働科学研究補助金、萌芽の先端医療技術推進研究事業、ナノメディシン分野(H14-ナノ-021)、および化学物質リスク研究事業(H18-化学-一般-006)の助成を得て行われた。

文 献

- 1) Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T : Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials* 2001, 22 : 1253-1262.
- 2) Uo M, Asakura K, Yokoyama A, Tamura K, Totsuka Y et al. : Analysis of titanium dental implants surrounding soft tissue using X-ray absorption fine structure (XAFS) analysis. *Chemistry Letters* 2005, 34 : 776-777.
- 3) Tamura Y, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T : Mechanical properties of surface-nitrided titanium for abrasion resistant implant materials. *Materials Transactions* 2002, 43 : 3043-3051.
- 4) Tamura Y, Yokoyama A, Watari F, Kawasaki T : Surface properties and biocompatibility of nitrided titanium for abrasion resistant implant materials. *Dent Mat J* 2002, 21 : 355-372.
- 5) Watari F, Yokoyama A, Omori M, Hirai T, Kondo H et al. : Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for bio-medical application. *Composites Science and Technology* 2004, 64 : 893-908.
- 6) Tamura K, Takashi N, Kumazawa R, Watari F, Totsuka Y : Effects of particle size on cell function and morphology in titanium and nickel. *Materials Transactions* 2002, 43 : 3052-3057.
- 7) Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M, Totsuka Y : Effects of Ti ions and particles on cellular function and morphology of neutrophils. *Biomaterials* 2002, 23 : 3757-3764.
- 8) Kiura K, Sato Y, Yasuda M, Fugetsu B, Watari F et al. : Activation of human monocytes and mouse splenocytes by single-walled carbon nanotubes. *J Biomed Nanotechnology* 2005, 1 : 359-364.
- 9) Yokoyama A, Sato Y, Nodasaka Y, Yamamoto S, Kawasaki T et

- al. : Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats. *Nano Letters* 2005, 5 : 157-161.
- 10) Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, Akimoto Y, Ogino S et al. : Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 *in vitro* and subcutaneous tissue of rats *in vivo*. *Molecular BioSystems* 2005, 1 : 176-182.
 - 11) Uo M, Watari F, Yokoyama A, Matsuno H, Kawasaki T : Tissue reaction around metal implants observed by X-ray scanning analytical microscopy. *Biomaterials* 2001, 21 : 677-685.
 - 12) Uo M, Watari F, Yokoyama A, Matsuno H, Kawasaki T : Visualization and detectability of rarely contained elements in soft tissue by X-ray scanning analytical microscopy and electron probe micro analysis. *Biomaterials* 2001, 22 : 1787-1794.
 - 13) Uo M, Watari F, Yokoyama A, Matsuno H, Kawasaki T : Dissolution of nickel and tissue response observed by X-ray analytical microscopy. *Biomaterials* 1999, 20 : 747-755.
 - 14) Uo M, Asakura K, Kohgo T, Watari F : Selenium distribution in human soft tissue determined by using X-ray scanning analytical microscope and X-ray absorption fine structure analysis. *Chemistry Letters* 2006, 35 : 66-67.
 - 15) 松田正己 : ナノテクノロジー戦略に及ばずアスベスト問題の影響—その理由と動向, 欧米の場合—. *現代化学* 2005, 417 : 14-16.
 - 16) Sato Y, Shibata K, Kataoka H, Ogino S, Fugetsu B et al. : Strict preparation and evaluation of water-soluble hat-stacked carbon nanofibers for biomaterial application and their high biocompatibility : influence of nanofiber-surface functional groups on cytotoxicity. *Molecular BioSystems* 2005, 1 : 142-145.
 - 17) Rosca ID, Watari F, Uo M, Akasaka T : Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon* 2005, 43 : 3124-3131.
 - 18) Wang W, Omori M, Watari F, Yokoyama A : Novel bulk carbon materials for implant by spark plasma sintering : *Dent Mat J* 2005, 24 : 478-486.
 - 19) Ushiro M, Uno K, Fujikawa T, Sato Y, Tohji K et al. : X-ray absorption fine structure (XAFS) analyses of Ni species trapped in graphene sheet of carbon nanofibers. *Physical Review B* 2006, 73 : 144103/1-11.
 - 20) Asakura K, Chun WJ, Tohji K, Sato Y, Watari F : X-ray absorption fine structure studies on the local structures of Ni impurities in a carbon nanotube. *Chemistry Letters* 2005, 34 : 382-383.
 - 21) Uo M, Tamura K, Sato Y, Yokoyama A, Watari F : The cytotoxicity of metal-encapsulating carbon nanocapsules. *Small* 2005, 1 : 816-819.
 - 22) Fugetsu B, Satoh S, Shiba T, Mizutani T, Lin Y et al. : Caged multi-walled carbon nanotubes as the adsorbents for affinity-based elimination of ionic dyes. *Environmental Science & Technology* 2004, 38 : 6890-6896.
 - 23) Fugetsu B, Satoh S, Iles A, Tanaka K, Nishi N, Watari F : Encapsulation of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in Ba₂₊-alginate to form coated micro-beads and their application to the pre-concentration/elimination of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl from contaminated water. *The Analyst (London)* 2004, 129 : 565-566.
 - 24) 亘理文夫・編 : 厚生労働科学研究補助金, 萌芽的先端医療技術推進研究事業, ナノメデシン分野. ナノチューブ, ナノ微粒子, マイクロ微粒子の組織応用性とバイオ応用(課題番号 : H14-ナノ-021), 平成14~16年度総合研究報告書2005, p1-377 ; 同 平成16/15/14年度, 総括・分担研究報告書. 一各年度毎—(平成16年度)2005, p1-227 ; (平成15年度)2004, p1-262 ; (平成14年度)2003, p1-168.
 - 25) Akasaka T, Watari F : Nano-architecture on carbon nanotube surface by biomimetic coating. *Chemistry Letters* 2005, 34 : 826-827.
 - 26) Akasaka T, Watari F, Sato Y, Tohji K : Apatite formation on carbon nanotubes. *Material science & Engineering C* 2005, 26 : 675-678.
 - 27) Watari F : *In situ* quantitative analysis of etching process of human teeth by atomic force microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 2005, 54 : 299-308.
 - 28) 亘理文夫 : 「見る」にこだわる—歯科医学研究への各種顕微鏡の応用展開—, *日本歯科医師会雑誌* 1999, 51 : 1199-1208.
 - 29) Aoki N, Yokoyama A, Nodasaka Y, Akasaka T, Uo M et al. : Strikingly extended morphology of cells grown on carbon nanotubes. *Chemistry Letters* 2006, 35 : 508-509.
 - 30) Aoki N, Yokoyama A, Nodasaka Y, Akasaka T, Uo M et al. : Cell culture on a carbon nanotube scaffold. *J Biomed Nanotechnology* 2005, 1 : 402-405.
 - 31) Yokoyama A, Gelinsky M, Kawasaki T, Kohgo T, Konig U et al. : Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen- an animal study, *J Biomed Mater Res Part B : Appl Biomater* 2005, 75B : 464-472.
 - 32) Liao S, Wang W, Uo M, Ohkawa S, Akasaka T et al. : A three-layered nano-carbonated hydroxy apatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 2005, 26 : 7564-7571.
 - 33) 熊澤龍一郎, 亘理文夫, 戸塚靖則 : チタン微粒子に対する *in vivo* および *in vitro* 生体反応とサイズ依存性, *歯科材料・器械* 2001, 20 : 356-365.
 - 34) 亘理文夫・編 : 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. 第1回研究会抄録集, 2005, p1-35 ; 第2回研究会抄録集, 2006, p1-45.

高齢者の QOL を改善するナノバイオマテリアルの開発

日本側研究者代表

亘理文夫

北海道大学大学院教授

中国側研究者代表

崔福斎

清華大学教授

緒言

高齢者の健康を維持し QOL を改善する生体材料には、体内で半永久的に機能する生体代替材料のインプラントとともに、生体に吸収されつつ骨形成を促し再生させる骨置換性材料も大きなニーズがある。その実現にはナノレベルで微細構造をコントロールし生体適合性・機能性を高めたナノバイオマテリアルの開発が必須である。アパタイトはマクロサイズでは骨誘導性はあるものの非吸収性で骨に置き換わることはなく、生体内の構造材料としてインプラントに使用されるが、50nm 以下のナノ結晶になると生分解性に変化し、自身は吸収されつつ新生骨に置き換わる骨置換性材料として新たな機能を発現する。本研究では骨類似のコラーゲン線維と炭酸基含有アパタイト微結晶からなり、気孔サイズ分布が骨に類似した複合体を生分解性ポリマー PLGA で強化した 3 次元スカフォールド (支持体) に構築した骨置換性ナノコンポジットバイオマテリアル (nHAC/PLGA) を開発した。さらにデンタルインプラントや歯周病等の歯科応用へ展開するために、GTR (Guided Tissue Regeneration) 膜に応用した。GTR 膜は歯周部への成長速度の大きい線維芽細胞の侵入を防ぎ、骨芽細胞が新生骨を形成する空間を確保して、骨再生を促す目的に用いられる。従来 GTR 膜の組成と構造は均一であったが、本研究では生分解性でかつ傾斜機能材料 (FGM) の概念を導入し、厚さ方向に組成が傾斜し、一方の面は多孔質で細胞成長が容易であり、反対面は平滑で細胞が附着しにくい、3 層構造から成る GTR 膜を開発した。

方法

I 型アテロコラーゲンを 0.5M 酢酸に加え、Ca/P = 1.66 (モル比) の Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} および $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-} = 0 \sim 10$ の CO_3^{2-} を含む溶液を添加し、室温で NaOH で pH 9 になるように滴定した。24 時間後、遠心分離と凍結乾燥により nCHAC を得た。炭酸化の定量は熱天秤で行い、生成物の同定を X 線回折で行った。アパタイト微結晶サイズは X 線回折ピークの半値幅から評価し、ナノコンポジットの形態とマイクロ構造を SEM, TEM を用いて観察した。次にポリ乳酸-グリコール酸共重合体とのコンポジットにして強化し、アパタイト-コラーゲン複合体の含有量を変えた 0.1mm 厚のシート状試料を作製した。アパタイト含有率 0 ~ 5 % のシート 3 層を張り合わせ、厚さ方向に組成傾斜した GTR 膜を作製した。

このナノコンポジットをスカフォールドとして MC3T3-E1 骨芽細胞の培養増殖実験を行った。

結果と考察

(1) ナノコンポジット (nCHAC/PLGA) の作製

コラーゲンにナノ炭酸ハイドロキシアパタイトを析出させ (nCHAC)、生体吸収性ポリ乳酸-グリコール酸共重合体ポリマーとのコンポジットを作製した。この複合体は、ナノサイズで結晶性が低く、天然骨の階層構造に類似した直径 4 nm の石灰化コラーゲンファイバー束からなることが確認された。炭酸濃度により結晶サイズとコラーゲン線維束の構造は変化し、コラーゲン含有率が高いほどアパタイト結晶は微細化し、 CO_3^{2-} は 2.8 最大 14 % まで含有できた。

(2) 傾斜機能型 (nCHAC/PLGA) GTR メンブレン膜の開発

アパタイト含有率を変えた約 100 μm 厚の nCHAC/PLGA 膜を 3 層重ね、外側から内にポリマー含有率が順次減少しアパタイトが増加する傾斜機能型 GTR 膜を作製した。3 層構造によりアパタイト含有量は 0 % (PLGA のみ) から、最大 5 % まで変化し、互いに強く接着し、良好な柔軟性を有していた。強度が最大で生分解速度が最小の最外側の PLGA 膜に比較し、nCHAC 添加とともに人工唾液中での分解速度が加速し、約 8 週間後から表面に顕著な多孔質化、溶出カルシウム濃度の上昇、酸性度の抑制効果を示した。MC3T3-E1 骨芽細胞を培養すると純 PLGA 膜よりも良好な反応性を示した。

この生分解性複合膜は、nCHAC 添加により、生体適合性に優れ、天然骨と同等の成分とナノ結晶サイズを有し、天然骨に対して高い骨伝導性を示し、GTR 膜として部位に応じて分解速度と強度が調節可能なことから歯根膜や骨組織の再生に有用であると考えられる。

参考文献

- 1) S. Liao, W. Wang, M. Uo, S. Ohkawa, T. Akasaka, K. Tamura, F. Cui, F. Watari: A three-layered nano-carbonated hydroxy apatite /collagen /PLGA composite membrane for guided tissue regeneration, *Biomaterials* 26(2005), 7564-7571
- 2) S. Liao, F. Watari, M. Uo, S. Ohkawa, K. Tamura, W. Wang, F. Cui: The Preparation and Characteristics of a Carbonated Hydroxyapatite/Collagen Composite at Room Temperature, *J. Biomed. Mater. Res.* 74B (2005) 817-821
- 3) S. Liao, K. Tamura, Y. Zhu, W. Wang, M. Uo, T. Akasaka, F. Cui, F. Watari: Human neutrophils reaction to the biodegraded nano-hydroxyapatite/collagen and nano-hydroxyapatite /collagen /poly(L-lactic acid) composites, *J. Biomed. Mater. Res.* 76A, (2005) 820-825

(本論文の原著をご希望の方は当協会へご連絡ください。)

ナノテクとその健康

巨理 文夫

北海道大学大学院歯学研究科 教授

1. 材料のナノサイジングと生体反応性

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。マクロでアレルギー性を示すNiはマイクロ/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が、こうしたイオン溶出に関連する効果はその典型例である。

一方、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。こうした現象にはある種の機能性転換が見られ、同一方向に特性が昂進する比表面積効果では説明できない。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(図1)。

2. 材料と生体反応(マクロ/ in vivo)

微粒子の生体反応を見る前にまず通常の場合、即ちマクロサイズの場合、即ちマクロサイズの材料に対する組織反応性を見ておこう。

図2に各種金属(a: Ni, b: Ti, c: Fe, d: Ag)をラット皮下に1週埋入した時の周囲軟組織を示す。Niでは組織が壊死し、強い為害作用を示すが、Tiではインプラントを被包化する線維性結合組織が形成されており、生体親和性に富む材料の典型的な反応である。Feは溶出は大きいが為害性は小さく既に被包化している。このFeへの反応はTiと類似しているが、より詳細に見ると細胞核の密度、染色濃度はFeのほうがよりも高く、相対的に生体反応がより強いことを示しており、純Tiのほうが長期的には生体親和性がより良好と予想される。Agでは線維

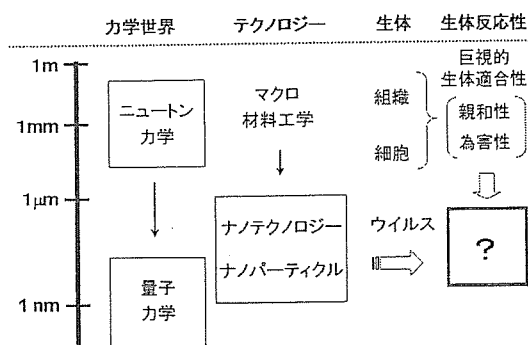


図1 材料のナノサイジングと生体反応性

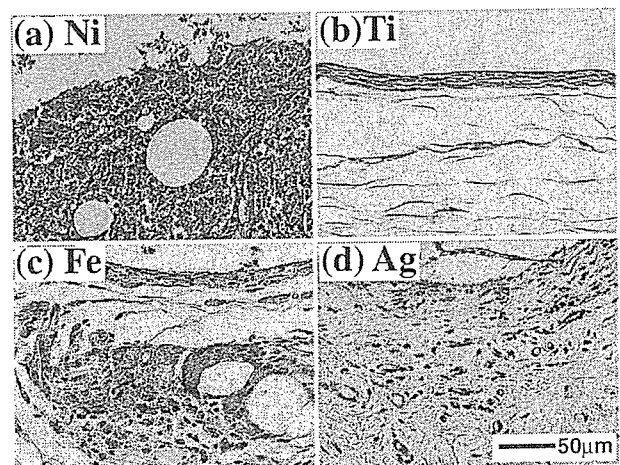


図2 各種金属に対する軟組織の反応(1週埋入後)

性結合組織はまだ形成途中にある。各材料の生体適合性の程度を敏感に反映して材質に依存して組織反応性が変化している。

3. 微粒子の生体反応性 (in vitro)

次にマイクロ/ナノ微粒子の生体反応性を in vitro 細胞機能性試験の結果で示す。図3のSEM像に示したサイズの異なるTi微粒子を混和した細胞培養液にヒト好中球を添加したときの活性酸素産生量を図4に示した。好中球は白血球の約50%を占める5~10 μ mと比較的小さな顆粒球で、生体内の異物に対して非特異的に反応する貪食細胞の1種である。微粒子サイズが150 μ mから0.5 μ mへ順次小さくなるにつれ、産生量が増加し、特に10 μ m以下で急激に増加しており、細胞が異物とみなして反応することがわかる。

図5はヒト好中球からのサイトカインIL-1 β の放出を示したものである。サイトカインは細胞から放出される比較的低分子量の蛋白質で細胞間のシグナル伝達、新たな細胞の分化・誘導等の機能を果たしている。サイトカインは多数存在するが、IL-1 β は炎症性反応の程度

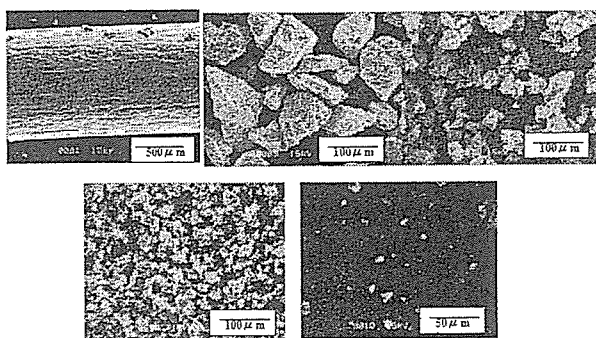


図3 サイズの異なるTi微粒子のSEM像(1mm ϕ , 150 μ m, 50 μ m, 10 μ m, 3 μ m)

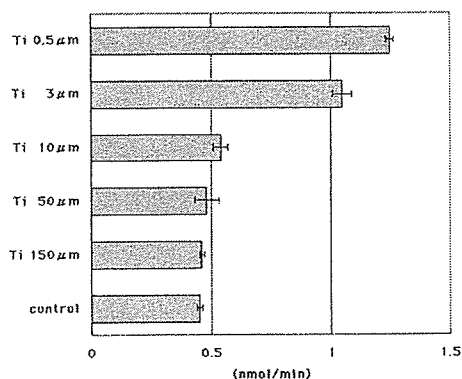


図4 サイズに依存する微粒子の生体刺激性(ヒト好中球からの活性酸素放出)

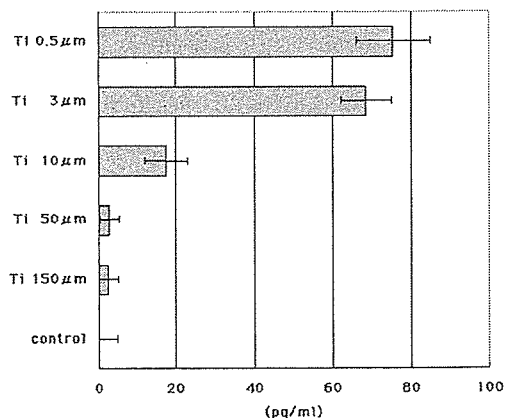


図5 ヒト好中球からのサイトカインIL-1 β の放出のTi微粒子サイズ依存性

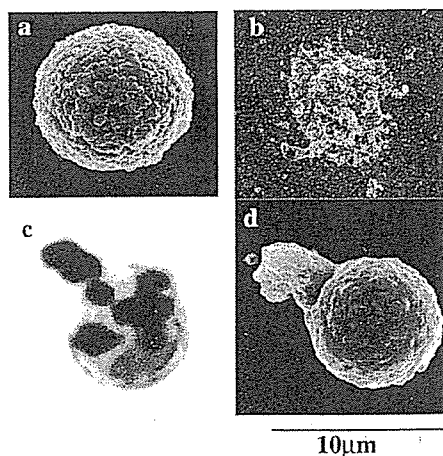


図6 各種微粒子に対するヒト好中球の反応: SEM像および顕像(c)。a:コントロール、b: Ni(0.5 μ m)、c: TiO₂(0.3 μ m)、d: Ti(0.5 μ m)

を示す最も代表的な指標の一つである。Ti 微粒子サイズが減少するとともに、放出量がとりわけ $10\mu\text{m}$ 付近から急激に増加しており、細胞刺激性を示すことがわかる。

これらの液中での好中球の形態を図 6 に示した。図 6 a は培養液中での通常の好中球の SEM 像(コントロール)であり、c, d は $0.3\mu\text{mTiO}_2$, $0.5\mu\text{mTi}$ 粒子混和液中で観察された、好中球が偽足を伸ばし貪食しようとしている様子をとらえた、それぞれ光学顕微鏡、SEM 像である。図 6 b は Ni 微粒子 ($0.5\mu\text{m}$) 添加の場合で、Ni の強い為害性のために細胞は破壊されている。好中球の大きさは約 $5\sim 10\mu\text{m}$ であり、 $3\mu\text{m}$ 粒子は貪食可能であるが、 $10\mu\text{m}$ 以上の粒子では困難である。この貪食を誘発する細胞以下の微粒子サイズ域と図 4, 5 に見られた生化学的機能性試験による刺激性の昂進する領域はよく一致している。

以上の条件下で Ti 微粒子からの溶出量の ICP 元素分析を行うと検出限界値以下でイオン溶出は無視できる。即ち、Ti 微粒子が示した刺激性・為害性は化学的イオン溶出が無くても発生するのであり、微粒子という物理的サイズ・形状に由来するものである。またこのような現象は溶解度等の化学的性質は異なるが、図 2 のように比較的良好な生体適合性を示す Fe でも同様に見られる。即ち、Ti, Fe 等の金属、 TiO_2 、カーボンナノチューブ等のセラミックス、ポリ乳酸等の高分子のいずれでも bioactive, bioinert な特性を有する材料共通に認められ、材料によらず非特異的に起きる効果である。

4. ナトキシコロジー

微粒子サイズがサブミクロンよりもさらに小さくなるとどのようなようになるのであろうか。同様に調べると刺激性は μm 前後 $\sim 0.5\mu\text{m}$ 付近を頂点として 200nm 付近以下になるとむしろ低下する。このことはナノテクノロジーを適用するには一見都合がよさそうに見える。しかし目的によっては意図に反して生体防御機構がもはや十分に働かず異物の侵入を許してしまうということにも通ずる。図 7 は 30nmTiO_2 粒子のラットへの強制露曝試験後の体内全身の X 線走査型分析顕微鏡(XSAM)による Ti 元素マッピング像である。化粧品に使われている 30nm の TiO_2 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肺から血中に取り込まれ、全身に拡散していることがわかる。これらは意図せずして血中を回流する効果である。

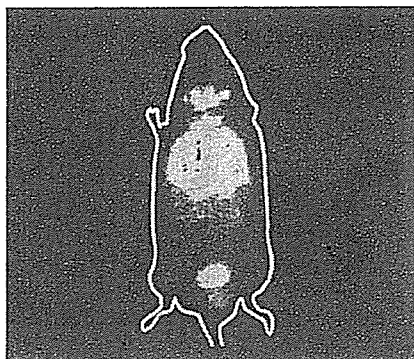


図 7 30nmTiO_2 粒子の強制露曝試験後の Ti 元素全身分布像。ナノ粒子は呼吸・消化器系を通じて体内に取り込まれ、全身に拡散する。

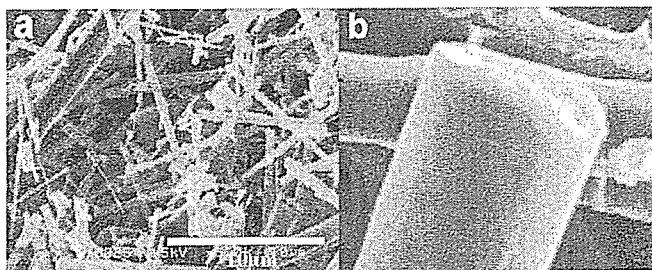


図 8 アスベスト(クロシドライト)とアスベスト代替品の SEM 像

5. 形状効果—アスベスト

アスベストの発ガン性はよく知られているが、その第一の要因は粉末形状が針状結晶であるために生ずる物理的微粒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、クリソタイルでは比較的湾曲した繊維状であるのに対し、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し、EDS 元素分析を行うと通常のシリケートの成分のほかにも多量の Fe を特徴的に含有している。図 8 はクロシドライトとアスベスト代替品(アルミナ)を同倍率で比較したものである。微粒子は約 $10\mu\text{m}$ 以下になると気管支を通過するが、代替品では大きさの点からも呼吸器系に侵入しにくい形態になっている。

6. アスベストとカーボンナノチューブ

カーボンナノチューブはそのユニークな構造と特性から(図 9)、電子・化学分野での応用が注目されているが、欧米からは肺ガン誘発性のあるアスベストとの形状の類似性の連想が

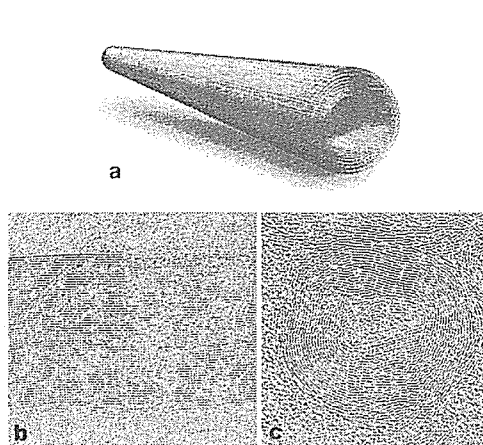


図 9 多層カーボンナノチューブの結晶構造模式図(a)と長さ方向(b) および垂直断面(c)の高分解能電顕像

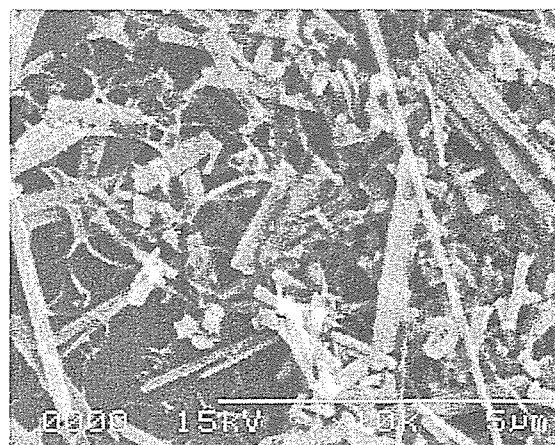


図 10 アスベスト(クロシドライト)の分散性とカーボンナノチューブの凝集性

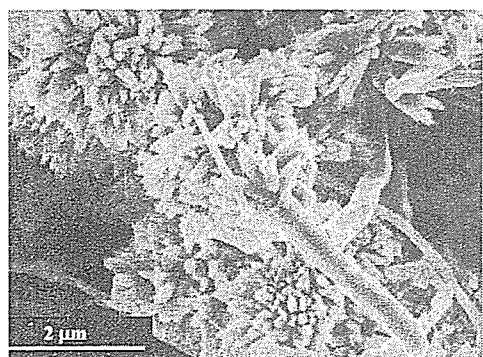


図 11 人工体液中でカーボンナノチューブ上に析出したアパタイト

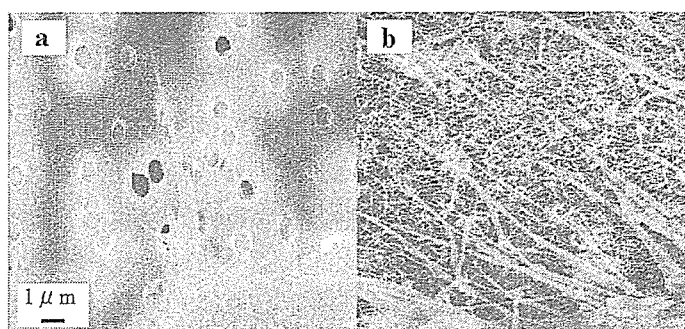


図 12 ポリカーボネート膜(a)、カーボンナノチューブ(b)の各スカフォールド上で培養した細胞末端の SEM 像。ナノチューブ上で細胞は末端から多数の細胞突起を張り出し強く付着する。

ら重大な為害性があるという論調が出されている。図 10 はアスベスト（クロシドライト）とカーボンナノチューブを水中攪拌後、乾燥した状態の SEM 像である。アスベストは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。図は乾燥時に集積した部分で針状のクロシドライトにナノチューブがまとわるように凝集している。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、ナノチューブは直径がクロシドライトよりもさらに小さく、屈曲性に富み疎水性で凝集しやすいことがわかる。

7. カーボンナノチューブのバイオ特性

カーボンナノチューブについて生体適合性試験を行うと、bioinert 材料一般に起きる程度の微粒子刺激性は有するものの、短中期的には特異的な生体為害性は認めず、むしろ生体材料として有利な種々の特徴を見出した。図 11 は人工体液に浸漬後のナノチューブの SEM 像で、針状または板状ナノアパタイト微結晶がナノチューブを基点に析出し放射状に成長している。こうした現象は Ti においても擬似体液に浸漬すると表面にリン酸カルシウムが析出するバイオミメティック・コーティングとして知られており、生体親和性を示す要因となっている。

図 12 はスカフォールドとしてポリカーボネート膜 (a)、カーボンナノチューブ (b) 上で骨芽細胞様細胞 Saos2 を培養したときの細胞末端の SEM 像である。ナノチューブ上では培養細胞は末端から多数の微細な細胞突起を遠方にまで張り出し強く付着する。同素体であるグラファイトでは細胞がきわめて付着しにくく、その血球に対する抗血栓性を活かして人工心臓弁材料として使用されているが、ナノチューブ上では細胞は高い接着性と良好な増殖性を示す。

8. ナノアパタイトの機能性転換

ハイドロキシアパタイトは骨、歯質など硬組織の主成分をなすリン酸カルシウムの 1 種で、図 13 にその 2 種の存在形態を SEM 像で示した。a はラットの犬歯のエナメル質であり、b は人工アパタイト焼結体である。a の天然歯牙では約 50nm のアパタイト微結晶列がコラーゲンとともに束となって 5 μ m 程度のエナメル小柱をなし、b の人工アパタイトでは不定形結晶粒がランダムに配向している。このように我々の骨や歯はナノアパタイトから構成されている。通常用いるマクロサイズの人工アパタイトでは、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インプラントとして残留し、それ自体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す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する。図 14 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 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、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っており、結果として骨置換性に働いている。

9. ナノテクと健康

こうした機能性転換は微粒子と細胞・組織とのサイズの相対的な関係に由来し、材料のみ由来する比表面積効果とは独立な事象である。マクロサイズの生体適合性には通常、溶解

イオンを通して作用する材質依存的な化学的効果が支配的である。もともとマクロで為害性を示すNiのような材料では微細化により、比表面積増大効果のため為害性はさらに著しくなる。一方、マクロで bioactive, bioinert な性質を示したTiのような材料でも in vitro, in vivo 試験の結果を総合すると、およそ 100 μm 以上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、50 μm 以下では刺激性が亢進し、特に 10 μm 以下になると細胞レベルでの貪食、組織レベルでの炎症を誘発する物理的サイズ効果による刺激性が顕現化し、金属、セラミックス、ポリマーのいずれでも非特異的に起きる。その為害性の程度は 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、急性の強いものではなく通常あまり問題ないと思われる。しかし in vivo 組織では貪食を誘発し、金属微粒子の場合には細胞死を導いて局所に残留し炎症を継続する点で注意が必要であり、長期蓄積するような条件下では炎症が慢性化し、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。

また 30nm の TiO_2 の強制露曝試験のように、微粒子サイズが 50nm 以下になると生体が異物と認識・処理できず、呼吸器系・消化器系を通じて直接リンパ液や血液に取込まれ全身に拡散し他臓器に影響を及ぼす可能性がある。この体内侵入の経路は薬剤投与から生体側摂取に至る経路と全く同じである。即ち、材料のナノサイジングにより化学反応は昂進するから、人間の意向とマッチすれば高機能性として働くのであり、一方意図せずして為害性に働くナノトキシコロジーとして現れたとしても現象の本質は同じなのであり決して不思議ではない。

この μm ~nm の微粒子が貪食・炎症を誘発することが局面によっては材料の機能性転換を引き起こし、刺激性にも高機能性にも作動し得る。こうしたナノテクノロジーの人体へのバイオ応用にはあらかじめマイクロ/ナノ微粒子の生体反応性に関する適切な理解と指針が必要である。ナノ微粒子は生体防御機構が想定していない対象である可能性があり、高機能性と刺激性の両面を併せ持ち、その制御が重要である。

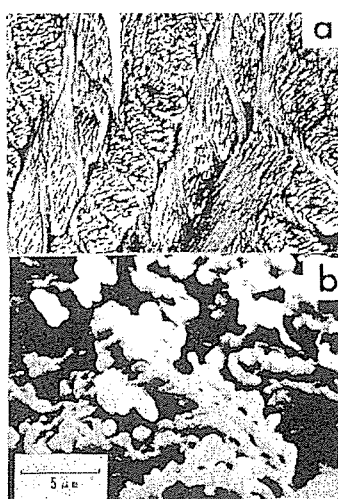


図 13 アパタイトの2種の形態—ラットの犬歯のエナメル質(a)と焼結アパタイト(b)のSEM像

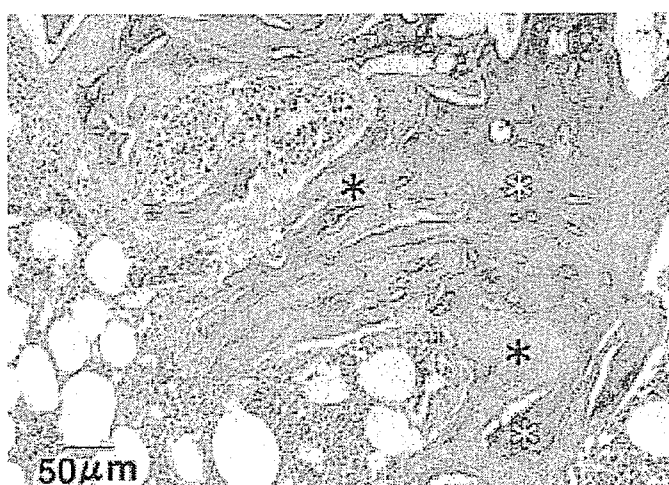


図 14 ナノアパタイト-コラーゲンコンポジットの骨置換性。ナノコンポジット部(黒*)の吸収と新生骨形成(白*)が不可分に生じ、結果として骨置換性が達成されている。



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

芳賀 信幸*

JJSB

Real-time observation of carbon nanotubes uptake in unicellular organism, Paramecium

The establishment of a standard method for the judgment of cytotoxicity of nanoparticles is one of the important problems to be quickly developed. We consider *Paramecium*, a unicellular eukaryotic organism, as a model system for the cytotoxicity test of nanoparticles because of their multiple cellular functions. By the observation of real-time uptake in *Paramecia*, it has been revealed that multiple-walled carbon nanotubes (MWCNT) have no remarkable cytotoxicity but high biocompatibility. Furthermore, MWCNT increased in growth rate when added in culture medium. The understanding of the mechanism of MWCNT effect on growth rate would be an important subject in near future.

ナノ微粒子に対する細胞毒性評価法の確立は緊急課題の一つである。単細胞性真核生物であるゾウリムシは多機能同時発現細胞として細胞毒性試験に適した実験生物である。細胞内取り込みリアルタイム観察により、多層カーボンナノチューブはゾウリムシに対して細胞毒性は示さず、高い親和性を持つことが明らかになった。さらに、多層カーボンナノチューブを培養液に添加することによって、細胞増殖速度が上昇することが明らかになった。

多層カーボンナノチューブのバイオ応用を視野に入れた増殖効果に関する分子機構の解明が、今後の重要な課題となるだろう。

Nobuyuki Haga*

Key words: 多層カーボンナノチューブ, 細胞内取り込み, 細胞増殖, ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*)

ゾウリムシの細胞特性と生態的ニッチ

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は、原生生物纖毛虫類に属する単細胞生物で、中学や高校の教材にも用いられるなど、原生生物のなかでは最もよく知られている生物の一つである¹⁾。細胞は長軸約 200 μm 、短軸約 20 ~ 30 μm の回転楕円体をしており、細胞の表面は規則的な配列パターンを持つ約 10 μm ほどの纖毛によって覆われている (図 1)。世界中の淡水域 (池, 沼, 湖, 下水道など) から採集され、細胞学, 遺伝学, 電気生理学など生物学の幅広い分野で研究対象とされている。

系統分類学的には、ゾウリムシは真核生物に分類され、細胞の内部構造や遺伝情報の基盤となる複

製・転写・翻訳系はヒトをはじめとする多細胞生物と共通である。また、大腸菌などの細菌類を餌とし、ミジンコなどの小型節足動物やメダカなどの小型魚類および稚魚などの餌となるため、生態学的にも重要なニッチ (生態的地位) を占めている^{2~4)}。

ゾウリムシの生活史は、接合からはじまる。接合は、多細胞生物の受精に相当する現象である。多細胞生物では、親となる個体から卵と精子がつくられ、受精後に新しい世代が生まれる。一方、ゾウリムシでは、親となる細胞から配偶核がつくられ、接合の間に両方の親細胞からつくられた配偶核同士で核融合が起こり、新しい世代の基盤となる核が出来上がる。この核を引き継いだ細胞が、新しい世代としてライフサイクルをはじめ⁵⁾。

接合は交配実験の手段として、古くから利用されてきた⁶⁾。世界のどの地域で採集されたゾウリムシでも、交配実験を行い、新しい子孫をつくる事が出来れば同じ種として判定され、登録されることになる。現在では、種に相当する 16 のグループ (syngen)

* Department of Biological Technology, Senshu University of Ishinomaki
石巻専修大学理工学部生物生産工学科
【略歴】 1974年 東北大学理学部生物学科卒業。1979年 東北大学大学院理学研究科博士課程修了 (理学博士)。1980年 ウィスコンシン大学分子生物学研究所研究員。1989年 石巻専修大学助教授。1997年 同教授、現在に至る。専門：細胞生物学、細胞工学、クロマトグラフィの分子機構に関する研究。趣味：テニス、リコーダー

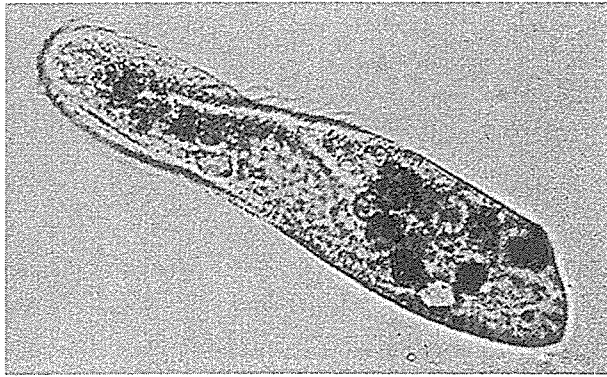


図1 Fe₂O₃を取り込んだゾウリムシ(生細胞)
細胞の表面には波打っている繊毛が見える。

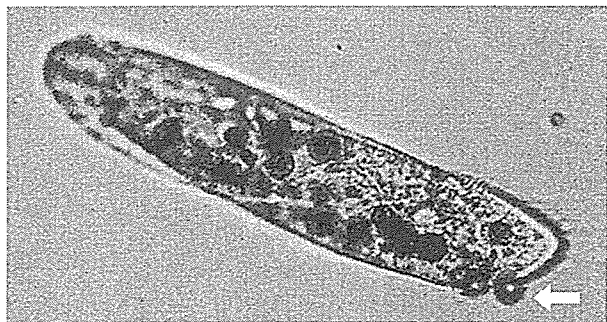


図2 TiO₂を取り込んだゾウリムシ(生細胞)
未消化のTiO₂を含む食胞が細胞肛門から放出された瞬間(矢印)

が記載されている。

ゾウリムシは実験室では通常25℃付近で培養するが、培養条件がよければ約8時間に一度の割合で細胞分裂を行う。このとき、ゾウリムシは細胞の表面に形づくられている細胞口から培養液中のバクテリアや固形物、液体成分などを取り込み、細胞質内に食胞とよばれる特殊な球状の小胞を形成する。食胞は、ライソゾームなどの消化系小胞と融合しながら細胞内を移動し、取り込んだ成分を消化・吸収する⁷⁾。その後、消化できなかった成分は細胞肛門から順次排泄される(図2)。

ゾウリムシには、温度、pH、各種陽イオンなどに応答する多彩な機能が備わっている。通常これらの機能は環境要因の変動に応じて発現し、遊泳行動として把握することが出来るので、ゾウリムシは“動く感覚細胞”や“動く神経細胞”とよばれる⁸⁾。また、細胞分裂能力も高く、安定している。1個の細胞から培養を開始することが出来るので、細胞分裂に対するさまざまな物質の影響を定量的に比較解析

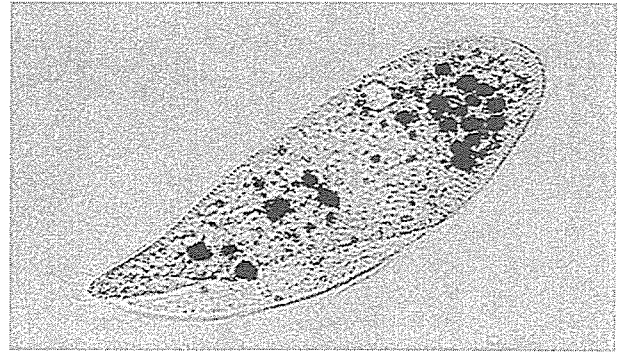


図3 生理食塩水中でのMWCNTの取り込み
黒い球状の食胞にはMWCNTが濃縮されて取り込まれている。

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			ANOVA (Tukey)
	平均	標準偏差	n	
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、異符合間でP<0.01で有意であることを示している。nは個体数

することが可能である。

以上のように、ゾウリムシはナノ微粒子の生体組織に対する為害性やバイオ応用への可能性を検討するうえで、すぐれたバイオアッセイ系を提供するものと考えられるが、基礎的な研究の報告例はきわめて少ない。本稿では、ゾウリムシの食胞形成を指標として、多層カーボンナノチューブ(multi-walled carbon nanotubes: MWCNT)の細胞内摂取とその後の動態について、オリジナルデータをもとに解説する。また、MWCNTの細胞分裂に対する影響についても新しい知見に基づいて考察する。

生理食塩水中でのMWCNTの取り込みと細胞内動態

金沢で採集されたゾウリムシ(KNZ0501)を用いて、生理食塩水(K-DS:NaをKに置き換えたDryl氏液)に分散した多層カーボンナノチューブ(MWCNT A1, 50 ng/μL, NanoLab社)の細胞内取り込み速度を測定した(図3)。取り込み速度は形成された食胞の数を指標として算出したが、後述する