

厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」 (H18-化学-一般-006)

第1回目標策定研究発表会プログラム

5月16日(火)

14:00~14:30

研究組織の紹介

研究全般について

「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」

北海道大学大学院歯学研究科生体理工学教室

亘理 文夫

14:30~14:45

バイオマテリアルとしての炭酸アパタイト結晶のナノ性状

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

○岡崎 正之、平田 伊佐雄

14:55~15:10

イメージング質量分析を用いた生体組織評価(1)

東北大学大学院環境科学研究科

○佐藤 義倫、田路 和幸

ブルカー ダルトニクス株式会社

蕪澤 崇

15:20~15:35

人工関節異物磨耗粉に対するマクロファージの反応
-MIF(マクロファージ遊走阻止因子)との関連-

北海道大学大学院医学研究科

○小野寺 伸、遠山 晴一、安田 和則

15:45~16:00

炭素を含む物質の高分解能電子顕微鏡観察

北海道大学エネルギー変換材料研究センター

○市野瀬 英喜

16:10~16:25

低加速電圧X線顕微検査装置の開発と

それによる燃料電池内の水滴など軽元素から成るサンプルの観察

東北大学名誉教授

○矢田 慶治

16:35~16:50

X線分光によるナノマテリアルのキャラクタリゼーション

北海道大学触媒化学研究センター

○朝倉 清高

17:00~17:10 休憩

17:10~17:25

カーボンナノ物質に対する生体反応-生体材料への応用と生体内分布-

北海道大学大学院歯学研究科

○青木 尚史、山本 悟、大堀 ことは、横山 敦郎、
野田坂 佳伸、赤坂 司、宇尾 基弘、亘理 文夫

東北大学大学院環境科学研究科

佐藤 義倫、田路 和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

葦澤 崇

17:35~17:50

生体観察を目指した TEM エンバイロメンタルセルの開発状況

北海道大学大学院工学研究科

○大貫 惣明、奥寺 公也、濱田 弘一

18:00~18:15

チタン摩耗粉・微粒子と体内動態

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

○淺岡 憲三

18:25~18:40

口腔がんにおける PET 診断

北海道大学大学院歯学研究科

○齊藤 正晃、北川 善政

18:50~19:05

ナノ・マイクロ微粒子の組織反応

北海道大学大学院歯学研究科

○高師 則行、田村 一央、戸塚 靖則

(発表なし)

蛍光ラベリングによる体内分布表示

北海道大学地球環境科学院

○古月 文志

5月17日(水)

9:00~9:15

カーボンナノカプセルの特性と生体内での分布について

北海道大学大学院歯学研究科
○宇尾 基弘、赤坂 司、亘理 文夫
東北大学大学院環境科学研究科
佐藤 義倫・田路 和幸

9:25~9:40

ナノサイズ結晶子炭酸アパタイトによる骨置換材の創製

九州大学大学院歯学研究院
○石川 邦夫

9:50~10:05

電界放出型X線源

名古屋工業大学名誉教授
○奥山 文雄

10:15~10:30

カーボンナノチューブセラミックス複合材料の合成とその生体応用

東北大学工学研究科
○大森 守、渡辺 孝、田中 雅明、山本 剛、横溝 健児、橋田 俊之
東北大学金属材料研究所
木村 久道、大久保 昭

10:40~10:50 休憩

10:50~11:05

DNAと酸化チタンのナノコンポジット

北海道大学名誉教授
○久保木 芳徳

11:15~11:30

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

北海道大学大学院歯学研究科
○赤坂 司、横山 敦郎、宇尾 基弘、亘理 文夫
東北大学大学院環境科学研究科
佐藤 義倫、田路 和幸
ブルカー・ダルトニクス 株式会社
韭澤 崇

(発表なし)

予防歯科的な診断機器への応用例

北海道大学大学院歯学研究科

森田 学

11:40～11:55

全体討論、今後の方針

北海道大学大学院歯学研究科

巨理 文夫

バイオマテリアルとしての炭酸アパタイト結晶のナノ性状

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

○岡崎 正之・平田伊佐雄

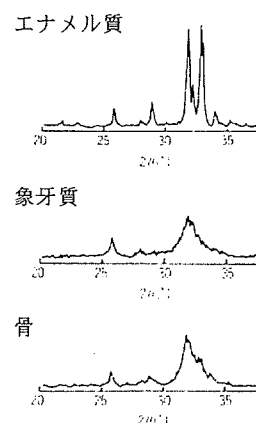
1. 炭酸アパタイトの結晶学

ヒトの硬組織である歯や骨の無機成分は、ハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ と呼ばれる狭義のバイオセラミックスから成り立っている。この無機成分に加え歯質エナメル質では、非コラーゲン性タンパク質がわずかに含まれ、象牙質や骨では有機成分としてコラーゲンが30~40wt%含まれる。この歯質エナメル質と象牙質、骨をX線回折してみると、非常に興味深いことに構成するアパタイトの結晶性がまったく異なる(図1)。エナメル質はきわめて結晶性が高いが、象牙質や骨の結晶性は低い。

アパタイトは、リン酸カルシウム的一种で、自然界には数多くの異なるアパタイトが存在し、歯や骨をつくるアパタイトがハイドロキシアパタイトである。このハイドロキシアパタイトは、六方晶系のイオン結晶で、1/3が結晶ユニットになっている。実際の生体アパタイトは、この Ca^{2+} , PO_4^{3-} , OH^- の位置に微量の元素が種々置換し、さらに複雑な構造になっている。 CO_3^{2-} も PO_4^{3-} の位置に数%置換し、生体アパタイトは、炭酸アパタイトとも呼ばれている。

この炭酸アパタイトは、炭酸含有量によって物理化学的性状が大きく異なる。従って、炭酸アパタイトを利用した生体材料を生体内へ埋入する場合には、生体親和性も大きく左右されることが予想され、時として生体内リスクを伴うことも完全には否定できない。

図1. 歯と骨のX線回折パターン



2. 炭酸アパタイトのナノ性状

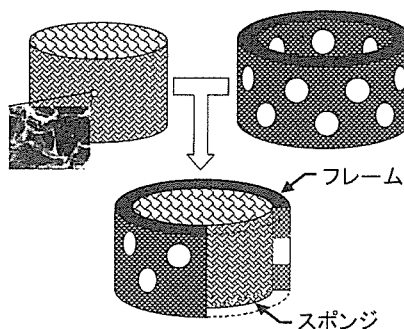
水溶液系で合成した場合、炭酸アパタイトは一般に合成温度が低くなると結晶性も悪くなり溶解性も増加してくる。炭酸イオンがアパタイト結晶内に取り込まれるにつれX線回折パターンの(300)回折線は高角度側にシフトし、a軸の格子定数が減少する。SEM観察では、80℃で合成された結晶性の良いハイドロキシアパタイトは大きな六方晶の板状結晶を示すが、炭酸イオンが増加してくるにつれ次第に丸みを帯び、合成温度が60℃と低くなると結晶もフレーク状から小さな結晶が凝

集したような像を呈するようになる。HR-TEMによるナノレベルでの観察においても、炭酸イオン含有量が増大すると最早六方晶の断面構造は示さなくなり多くの格子欠陥が認められるようになる。

3. 炭酸アパタイトの生体材料への応用

組織工学による再生医療には、細胞やサイトカインに加えて、スカフォールドの存在は欠かせない。特に、細胞の3次元培養可能な多孔性のスカフォールド生体材料が期待されている。我々は、骨アパタイトに類似した結晶性と組成を有する炭酸アパタイトの合成を行い、得られた粉末結晶試料をコラーゲン溶液と混合し、凍結乾燥することによりスポンジ状スカフォールドの創製を確立している。また、ポーラスなアパタイト円筒状フレームを作成し、スポンジとハイブリッド化することにより、生体骨の緻密骨と海綿骨に類似した構造をもつ人工骨の創製も可能となっている（図2）。もしここへ血管新生因子や骨増殖因子のようなサイトカインを導入できれば、高機能を有する生体模倣の人工骨の創製が可能となる。本研究では、その際の炭酸アパタイトの生体親和性と生体内安全性をナノレベルで評価できる解析手法を検討するとともに、さらには炭酸アパタイト複合体の最適化を検討して行く予定である。

図2. フレーム強化炭酸アパタイト・
コラーゲンスカフォールド



イメージング質量分析を用いた生体組織評価（1）

東北大学大学院環境科学研究科

○佐藤 義倫・田路 和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

菫澤 崇

1. 生化学領域における質量分析

ヒトゲノムの解読が完了した 2000 年以降、ポストゲノム研究としてプロテオミクス解析が広く行われている¹⁻⁶。プロテオミクスは、生体内で遺伝子から翻訳されて合成される膨大な種類のタンパク質を網羅的に同定・解析することで生体メカニズムの解明や疾患の治療法の開発に役立てようと、タンパク質を扱うプロテオーム解析（proteome; protein+genome の造語）、ペプチドを扱うペプチドーム解析（peptidome; peptide+genome）、糖鎖および糖ペプチド、糖タンパク質を扱うグライコーム解析（glycome; glycogen+genome）を駆使し、生体内の機能に関する解明を試みる学問である⁷⁻¹⁰。その中でも、特に疾患をターゲットに研究を行う“臨床プロテオーム解析”が注目されている¹¹⁻¹³。この分野での試料は一般に極微量であることが多く、高感度で、かつ得られる情報量の多い分析方法が必要とされており、それを満たす手法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry）が広く使用されている。一般に、正常および疾患検体から採取した血清、血漿や髄液等を簡易精製した後質量分析を行い、得られた正常／疾患の複数のスペクトルパターンから解析ソフトウェアを用いたクラスター解析およびバイオマーカー（その存在によって正常・疾患を区別できる物質）探索を行う研究である^{14,15}。

近年、発見されたバイオマーカーをターゲットとし、生体組織内でそのマーカーがどの部位に存在するかを 2 次元的に可視化し、モニタリングおよび解析を行うことができる“イメージング質量分析”が注目されている。この方法は疾患がどの部位にどの程度存在するかを視覚的にとらえることが可能な唯一の方法と言える¹⁶。これらの研究は、テーラーメイド医療、診断および治療の実現に結びつく、非常に重要な領域である。一方、ナノテクノロジーの進歩も生化学領域に及び、テーラーメイド医療に向けての研究が進められている。選択的部位に薬物投与を目的とするドラッグデリバリーシステム（DDS）、癌治療を目指す磁性粒子ハイパーサーミア、同時にこれらのナノバイオテクノロジーに使用されるナノ材料（ナノ粒子、フラーレン、カーボンナノチューブ）の体内への影響を研究するトキシコロジー等がさかんに行われており、各種異分野の融合が今後のプロテオミクス研究に必要不可欠である。これらの複合的プロテオミクス研究に質量分析を応用する際には、いくつかの課題が生じる。包括的プロテオーム解析という観点から、測定の高スループット化、

再現性向上、および目的物質の比較定量化、またナノテクノロジー分野では投与する薬剤自体の厳密な素材評価、さらに臨床プロテオーム解析では多検体解析への対応等といった問題が挙げられる。それらを解決することに加え、臨床プロテオーム解析で重要なバイオマーカーの位置情報、イメージング質量分析による新規ナノテクノロジー-DDS 薬剤の生体内到達部位の位置情報、ナノ材料の代謝による位置情報などの獲得が実現すれば、この画期的技術は、これからのプロテオミクス解析、さらには臨床医療分野やナノテクノロジー分野においても幅広く利用されていくものと期待される。

2. マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

一般に質量分析装置は、試料をイオン化する部分（イオン源）と、イオンを質量の違いによって分離する部分（分析計）に大きく分けられる。イオン化法の1つであるMALDI（図1）と分析法の1つであるTOF（図2）を組み合わせた

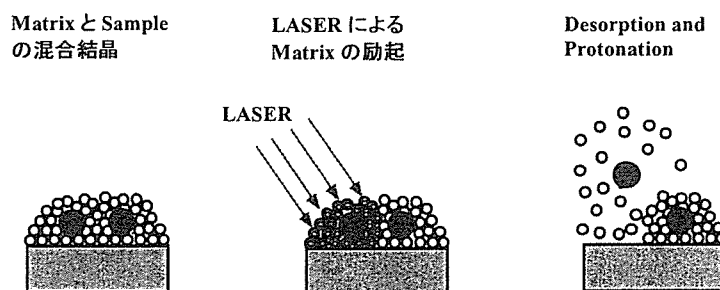


図1 MALDIの概略図

MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry : マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析) は、タンパク質のような分子量 100kDa を超える化合物までも分解させずに測定できるMALDI(Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization)のソフトなイオン化と、TOF (Time-Of-Flight) の操作性の良さにより、生体高分子における質量分析法としてMALDI-TOFは一般的なものになりつつある。また、2002年にはMALDIの開発者である田中耕一氏がノーベル賞を受賞したことにより、機器分析の一手法としてより広く認識された。当然、プロテオミクス解析においても広く用いられている。

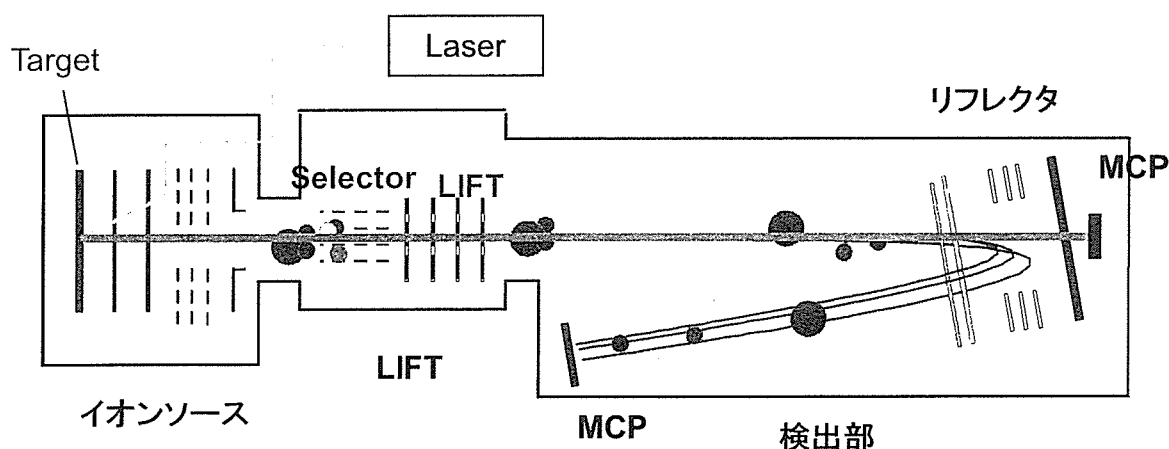


図2 TOF-MSの概略図

MALDIは数あるイオン化法の中の一つであり、文字通り試料がマトリックスに支援されてレーザー脱離・イオン化される方法である。これは、試料そのものにレーザー照射して脱離・イオン化を行う従来のLD (Laser-Desorption:レーザー脱離) に改良を加えた方法と言える。LDとの違いはマトリックスの存在のみであるが、LDではうまく脱離又はイオン化されないことの多い生体高分子試料に対して非常に有効な手法である。図1に示すように、試料・マトリックス混合結晶に高密度なレーザー光(窒素レーザー(337 nm)が用いられることが多い)が照射されると、まずはマトリックスがレーザーの光子を吸収して励起状態に達し、それと同時に結晶の温度が上昇して試料もろとも脱離(昇華)する。これによって試料単体ではうまく脱離しないものでも「マトリックス支援」によって脱離されることになる。次に、蒸発した試料は高い励起状態にあるマトリックスによって化学的イオン化を受ける。その過程はいくつか考えられるが、多くの場合はマトリックス分子から解離したプロトンが試料分子に移動して見かけ上イオン化された状態になる(擬分子イオン化)。

TOFとは「飛行時間型」のことで、磁場型やイオントラップと並ぶイオン分離法の一つである。その概略を図2に示す。レーザー照射によって生成されたイオンを電場によって加速する。この時に低分子量のイオンは速く、高分子量のイオンは遅く飛行するため、分子量ごとに飛行時間が異なることになる(これは運動エネルギーの方程式、 $E=(1/2)mv^2$ で単純に理解できる。Eは電場の大きさとイオンの電荷で決まるため、イオンの質量数とは関係なく一定と考えることができる。とすれば、mが小さい場合はvが大きく、mが大きい場合はvが小さくなくてはならない)。最終的にリニア検出器でイオンを検出することで飛行時間を測定し、飛行時間から換算することで分子量を求める(リニアモード測定)。また、反射場(リフレクタ)を用いてイオンを反射させ、飛行しているイオンの時間分布を収束させて高分解能測定を行う場合もある(リフレクタモード)。さらに最近では、一度加速したイオンを再度加速することでMS/MS測定をよりハイスループット・高感度・高精度で行うためのTOF/TOFと呼ばれる装置も開発されている。

3. イメージング質量分析

イメージング質量分析は1996年から研究されるようになった、非常に新しい分析方法である。分析部には一般にMALDI-TOF-MSが用いられ、ターゲットプレートに貼り付けられた薄膜試料、もしくは薄膜状に調製された試料をxy方向に走査するようにレーザーを照射して測定を行う。結果は、測定されたスペクトルの各分子量について、その種類および量をそれぞれ色およびその濃淡で表示させ、イメージングとして出力する。原理的には薄膜でさえあれば試料は生体組織に限定されるものではない。生体組織を例にとると、図3のように試料は生体組織を凍結し、マイクロームによって5.0 μm ~ 30 μm 程度にスライスした凍結切片を用いる。これを導電性のスライドガラス等に固定し、洗浄および乾燥させてから測定に用いる。マトリックスは、測定目的に応じて不連続

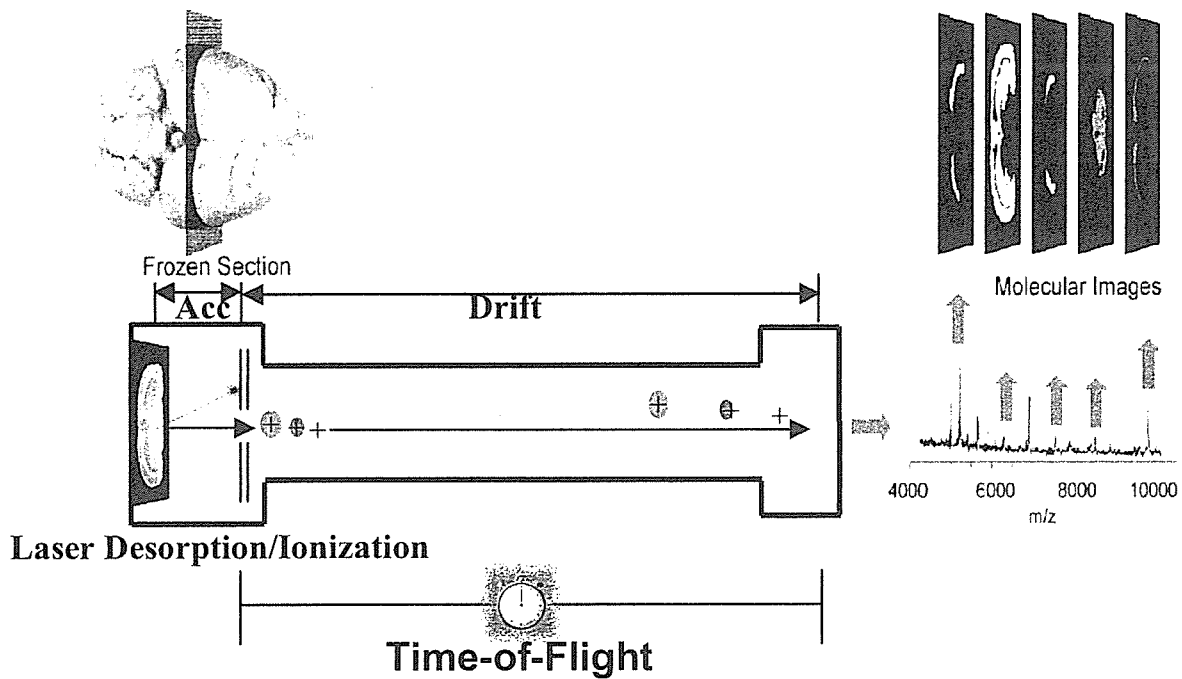


図3 イメージング質量分析の概念図

Modified from: Lottspeich, Zorbach, eds "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag, 1998
and M. Stoeckli et al. Analytical BioChemistry 311 (2002)33-39

的に添加、もしくは、スプレーによって均一に添加し、測定を行う。原理的には非常に簡便な装置であるが、イメージング質量分析を行うためには、測定用のソフトウェアおよび2次元に可視化するためのソフトウェアの2つを組み合わせることが不可欠である。Vanderbilt大学のR. M. Caprioliらは、パーキンソン病¹⁷、脳腫瘍¹⁸、肺がん¹⁹、大腸がん²⁰、前立腺がん²¹等の腫瘍組織を用いたイメージングや、バイオマーカーの探索を意欲的に進めている。彼らはサンプルの前処理方法等の基礎研究も行っており、現在この分野で世界的にもトップを走るグループと言える^{22,23}。

Caprioliらによると、図4に示すように、測定は目的によって「プロファイリングモード」および「イメージングモード」で行う。プロファイリングモードでは、マトリックスを不連続的にスポットし、各スポット内で得られるスペクトルの差異からその部位に特有のバイオマーカーを探索することを目的とする。イメージングモードでは、組織切片上にマトリックスを均一に噴霧し、必要な解像度で連続的に測定を行い、結果を2次元に可視化することを目的としている。

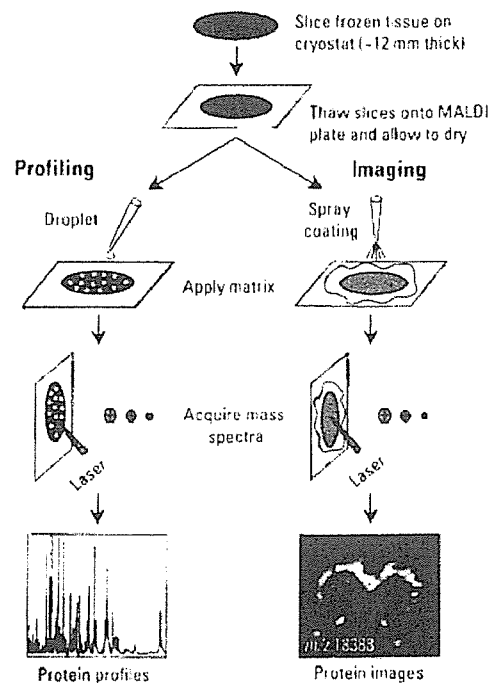


図4 イメージング質量分析の測定モード
R. M. Caprioli et al., Anal.Chem 2004, 1, 86A-93A.

4. ナノ粒子の体内動態可視化と本研究の目的

21世紀高齢社会における健康福祉増進、クオリティ・オブ・ライフ実現のためには、ナノテクノロジーの貢献が不可欠である。とりわけ、ドラッグデリバリーシステム（DDS）や癌治療である磁性粒子温熱療法（ハイパーサーミア）をはじめとするナノマテリアルの人体へのバイオ応用には、あらかじめ起こり得る生体反応と条件を周到に把握する必要がある。一方で、ナノテクノロジーの発展による金属ナノ粒子や、フラーレン、カーボンナノチューブをはじめとするナノカーボン材料の高機能性と共に有害性も増進する可能性が挙げられている。その安全性を確認する上で必須の体内挙動を解明するために、本研究班では以下の研究を行う。

4 - 1. バイオ用ナノ粒子の作製

本研究課題に必要な様々な種類の金属、および形状を持つ金属ナノ粒子の合成、及び親水性カーボンナノチューブの調製を行う。

4 - 2. 炎症性バイオマーカーの可視化

現在、ナノ粒子凝集体、インプラント材料などによる炎症反応は、光学顕微鏡などによる組織学的観察による専門的な知識と経験が必要不可欠である。炎症性の低い材料などによる炎症性や早期炎症性においては、素人の研究者では光学顕微鏡写真で炎症性度合いを判断することが困難である。そこで、質量分析によって炎症におけるバイオマーカーを探索し、イメージングすることで炎症度合いの可視化を試みる。

4 - 3. フラーレンの体内動態可視化

ナノテクノロジー分野において、 C_{60} はその生理活性機能が期待され、様々な研究が行われている。XSAM、SEM-EDX、EPMAなどの測定装置では、炭素で構成されているフラーレン（ C_{60} ）を有機化合物である生体内で検出することは不可能である。したがって、放射性元素によるラベリングすることにより、生体内代謝機能が調べられているが、放射性元素を扱うには設備が必要であり、容易な実験ではない。フラーレンは非常に安定な構造（ sp^2 構造）を有することが知られており、また化学修飾を行うことによって水溶化も可能である。修飾部位は sp^3 結合になるため、容易に解離することが予測される。つまり質量分析においても、水溶化フラーレンのようなフラーレン誘導体はイオン化の段階で解離を起こし、もとの完全な状態を観測することはできない。解離して修飾部位の外れたフラーレンとその開裂イオンのみが観測されることがすでに実証されている。そこで、選択的標識を有したフラーレン誘導体を用いることによる、間接的モニタリングの実現を図る。つまり、目的のマーカーに選択的に結合するような水溶化フラーレンを設計して生体組織に導

入すると、マーカー部分だけにフラーレン誘導体が結合する。マーカーが存在した部分のみからイオン化が起こり、解離イオンであるフラーレンを測定することにより、生体内のどの部位に濃縮しているのかイメージングを行う（図5）。

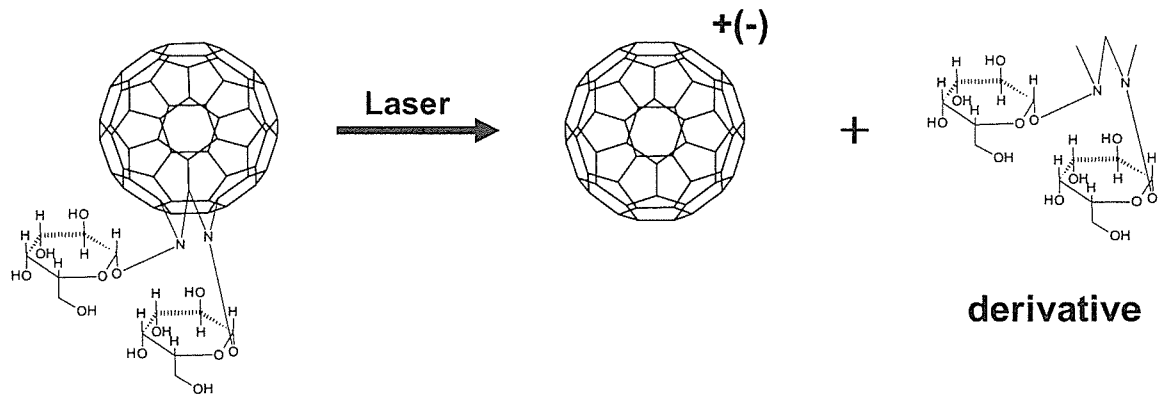


図5 水溶化フラーレンの解離モデル

References

- 1) J. R. Yates III et al, *Anal. Biochem.*, 1993, **214**, 397.
- 2) A. Shevchenko et al, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 850.
- 3) D. J. C. Pappin et al, *Curr. Biol.*, 1993, **3**, 327.
- 4) M. Mann et al, *Biol. Mass Spectrom.*, 1993, **22**, 338.
- 5) P. James et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **1**, 58.
- 6) W. J. Henzel et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, **90**, 5011.
- 7) D. F. Hochstrasser, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1998, **36**, 825.
- 8) M. J. Page et al, *Drug Discovery Today*, 1999, **4**, 55.
- 9) W. P. Blackstock, M. P. Weir, *TIBTECH*, 1999, **17**, 121.
- 10) C. D. O'Connor et al, *Methods Microbiol.*, 1998, **27**, 191.
- 11) E. F. Petricoin et al, *Lancet*, 2002, **359**, 572.
- 12) J. D. Wulfkuhle et al, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**, 267.
- 13) J. Villanueva et al, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1560.
- 14) M. Merchant et al, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 1164.
- 15) D. F. Ransohoff, *J. Natl. Cancer Inst*, 2005, **97**, 315.
- 16) R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 4751.
- 17) J. Pierson et al, *J. Proteome Res.*, 2004, **3**, 289.
- 18) S. A. Schwartz et al, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 981.
- 19) K. Yanagisawa et al, *Lancet.*, 2003, **362**, 433.
- 20) P. Chaurand et al, *Proteomics*, 2001, **1**, 1320.
- 21) N. Masumori et al, *J. Cancer Res.*, 2001, **61**, 2239.
- 22) S. A. Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.*, 2003, **38**, 699.
- 23) J. L. Norris et al, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6642.
- 24) M. C. Galicia et al, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1891.

人工関節異物磨耗粉に対するマクロファージの反応—MIF（マクロファージ遊走阻止因子）との関連—

北海道大学大学院医学研究科運動機能再建医学分野

○小野寺伸、遠山晴一、安田和則

【はじめに】人工関節置換術後に生じるゆるみ・骨溶解現象において、マクロファージは主とし手摺動面より発生する異物磨耗粉を貪食し骨吸収性因子（TNF- α 、IL-1 β 、PGE2）を放出することにより、中心的に関与する。マクロファージ遊走阻止因子（MIF）は1989年ヒト cDNA がクローニングされて以来、炎症・腫瘍等さまざまな疾患における関与が報告されている。本研究では異物磨耗粉に起因する人工関節ゆるみ・骨溶解現象における MIF の役割を検討した。

【方法】1）人工股関節ゆるみの再置換術における偽滑膜・骨溶解部組織を採取し、免疫組織学的に MIF の存在を検出、また RT-PCR により MIF mRNA の発現を検討し、正常滑膜組織における発現と比較した。2）マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に各種濃度の 0.75 μ m 径蛍光ラテックスビーズを添加し、貪食量をフローサイトメトリーにより定量、またこのときの培養上清中 MIF 濃度を ELISA により、細胞における MIF mRNA 発現を Northern blot により検討した。3）RAW264.7 を 1 μ g/ml 以上のリコンビナント MIF にて 48 時間前処置した後に同蛍光ラテックスビーズを添加し、ビーズ貪食量をフローサイトメトリーにより定量した。

【結果】1）検討したすべての偽滑膜組織において単核・多核のマクロファージ様細胞の細胞質において MIF が陽性であった。これらの細胞は高頻度にポリエチレン磨耗粉を貪食していた。間質細胞では MIF は検出されなかった。偽滑膜組織における MIF mRNA の発現は正常組織より亢進していた。2）蛍光ビーズ添加濃度に比例した貪食量が観察され、また培養上清中 MIF 濃度は蛍光ビーズの濃度依存的に増加した。蛍光ビーズ貪食により MIF mRNA の発現も増加した。3）MIF 前処置により RAW264.7 による蛍光ビーズ貪食量は約 1.6 倍に増加した。

【考察】人工関節ゆるみにおいてマクロファージの産生する TNF- α 、IL-1 β 、PGE2 等の骨吸収因子、および繊維芽細胞の産生するマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）が重要とされているが、MIF はこれらの産生を促進することが報告されている。偽滑膜組織においてマクロファージ様細胞がポリエチレン異物磨耗粉を貪食して MIF を放出し、これが各種細胞に paracrine に作用しゆるみ・骨吸収を促していくメカニズムが推測される。また一方、MIF はマクロファージのスカベンジャー作用を活性化し、異物磨耗分の貪食・排除をも促している可能性が示唆された。

炭素を含む物質の高分解能電子顕微鏡観察

市野瀬英喜

電子顕微鏡誕生のきっかけは、光学顕微鏡の分解能が波長の壁に突き当たった事であった。顕微鏡が見分けることの出来る小ささは、ほぼ波長程度だから、光学顕微鏡はウイルスの登場に対応できなかつたらしい。しかし、光学顕微鏡がリケッチアなら観察できた時(1932)に生まれた電子顕微鏡の倍率は、高々二桁台であった。それが、2年後に早くも2万倍となり、そのとき撮られた大腸菌の写真は明らかに電子顕微鏡の方が明瞭である。技術の世界では、改革は間違いなく改良に勝る。

電子顕微鏡の観察対象に非生物系の物質が加わり、局所的な結晶構造の乱れの観察などで、大きな成果を上げ、本来の観察対象である生物系分野に於いては、特に解剖学での寄与が大きかったのは記憶に新しい。その後の電子顕微鏡の性能向上は著しく、今日では「原子構造観察」は容易とは言えないが、中程度の重さで構造が簡単な金属などでは、なんとかなる。最近では異種の原子をも、重さが極端に違うものでなければ、同時に識別観察することも出来るようになった。しかし極端に重たい原子や軽い原子は依然苦手である。重たい元素は形を正直に投影することが難しいし、軽い元素はぼやけて見えにくい。生体を構成する主要元素である炭素は、どちらかといえば軽すぎて見えない部類に属する。今のところ、炭素のみで出来ている物質ではダイヤモンド、カーボンナノチューブ、などの観察できている。炭素と炭素以外の元素から出来ている物質では、炭化珪素で明瞭な像が結ばれている。

電子顕微鏡の観察対象に得手不得手があるのは、電子顕微鏡の最大の利点と丁度背中合わせの関係になっている事による。電子線は原子1個でも観察できるほどに原子との相互作用が強いが、このために重たい原子の中では位相が極端に変わってしまうので、本来黒く見える原子の一部が白く見えたりする。一方軽い原子ではさすがの電子もなかなか散乱されにくい。つまり見えにくい。此に分解能や、焦点外れと言った光学的な条件が加わるので、現時点に於いては本当のところ、「原子構造観察の実際」は決して容易とは言えない。上のような条件を実際の観察における試料厚みで要約すると、凡そ5ナノメートルになるが、図Iはこうした条件を満たして観察された炭化珪素素である。太く黒いのがシリコン、薄いのが炭素である。30年先には、炭素、窒素、リン、水素などで出来た複雑な構造の物質、つまり生体物質、の原子構造観察すら一般的になるのではないだろうか。

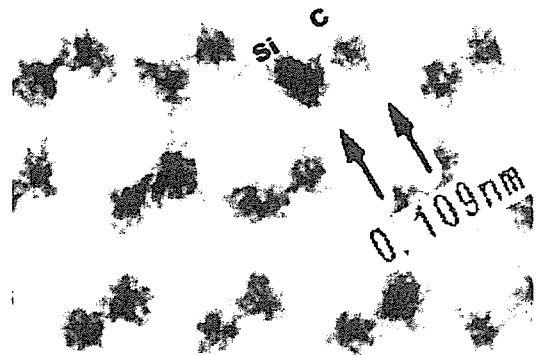


図1. 炭化珪素の原子構造

低加速 X線顕微検査装置による生物試料や燃料電池内の水滴など

軽元素よりなるサンプルの観察

(株) 東研 矢田慶治

1. 緒言

最近、半導体デバイスの構造が著しく微細化され、且つ多層化されつつある。配線幅などもサブミクロンからナノメータになりつつあり、2010年には45nmになると言われている。これに対応して、X線顕微検査装置の分解能を改善する必要がある。現在、東研では、サブミクロンの0.4 μ mから、電界放射電子銃を用いることによって、100ナノメータへ分解能を向上することに成功しているが、更に分解能を改善するとともに、微細な構造物に対しても十分なコントラストを与えるように低加速電圧X線顕微検査装置の開発を行っている。これには、適切なターゲット材質と加速電圧の選定、X線経路内のHeガスの充填といったことが必要になるが、これによって生物試料の微細構造の観察や燃料電池駆動中に生成する水滴を可視化することが可能となるであろう。

ここでは、生物試料について今までに試みた結果[1]と燃料電池内部に生成される水滴の観察の試みについて述べる。

2. 生物試料の観察結果

2-1 銀染色されたニューロンの厚切り切片

走査電顕をX線顕微鏡に改造した装置でゴルジ銀染色されたニューロン組織を観察すると、X線的にコントラストが良く付き、Tiターゲット、30kVで150-200 μ mの厚さのもので空気中でもspineなどが綺麗に観察される。

2-2 フォルムバル膜上に培養されたHeLa細胞

HeLa細胞を観察した例を図1に示す。(a)は光顕像、(b)はサンプルが空気中の場合、(c)は空気をHeガスで置換した場合、(d)は真空中の場合のもので、共に10kV、Geターゲット、ターゲットから写真フィルムまでの距離約5cmの条件である。この条件では、 $Ge L_{\alpha}$:10.4 \AA が空気中ではほとんど吸収されるが、Heガス中では吸収されずに真空中と変わらない像が得られている。このことは空気中とHeガス中での吸収を計算する事で知ることができる。図2は、 $Ge L_{\alpha}$:1.04nm, $Ta M_{\alpha}$:0.725nm, $Ti K_{\alpha}$:0.275nmの特性X線の空気中とHeガスとで吸収を計算で示したものである。仮に吸収が半分になる辺りの空気層の厚さを注目すると $Ge L_{\alpha}$, $Ta M_{\alpha}$ 線では数mmで、 $Ti K_{\alpha}$ 線でも10cmである。それがHeガス中では前者は50倍程度、後者の場合は600倍程度のびることが解る。

3. 燃料電池内の水の観察

3-1 ターゲット

燃料電池内に生成される水滴の挙動を知ることは重要で、今まで主として中性子ラジオグラフィ、MRIイメージング法が用いられてきた。これらの方法は水素に対する衝突断面積が特異的に

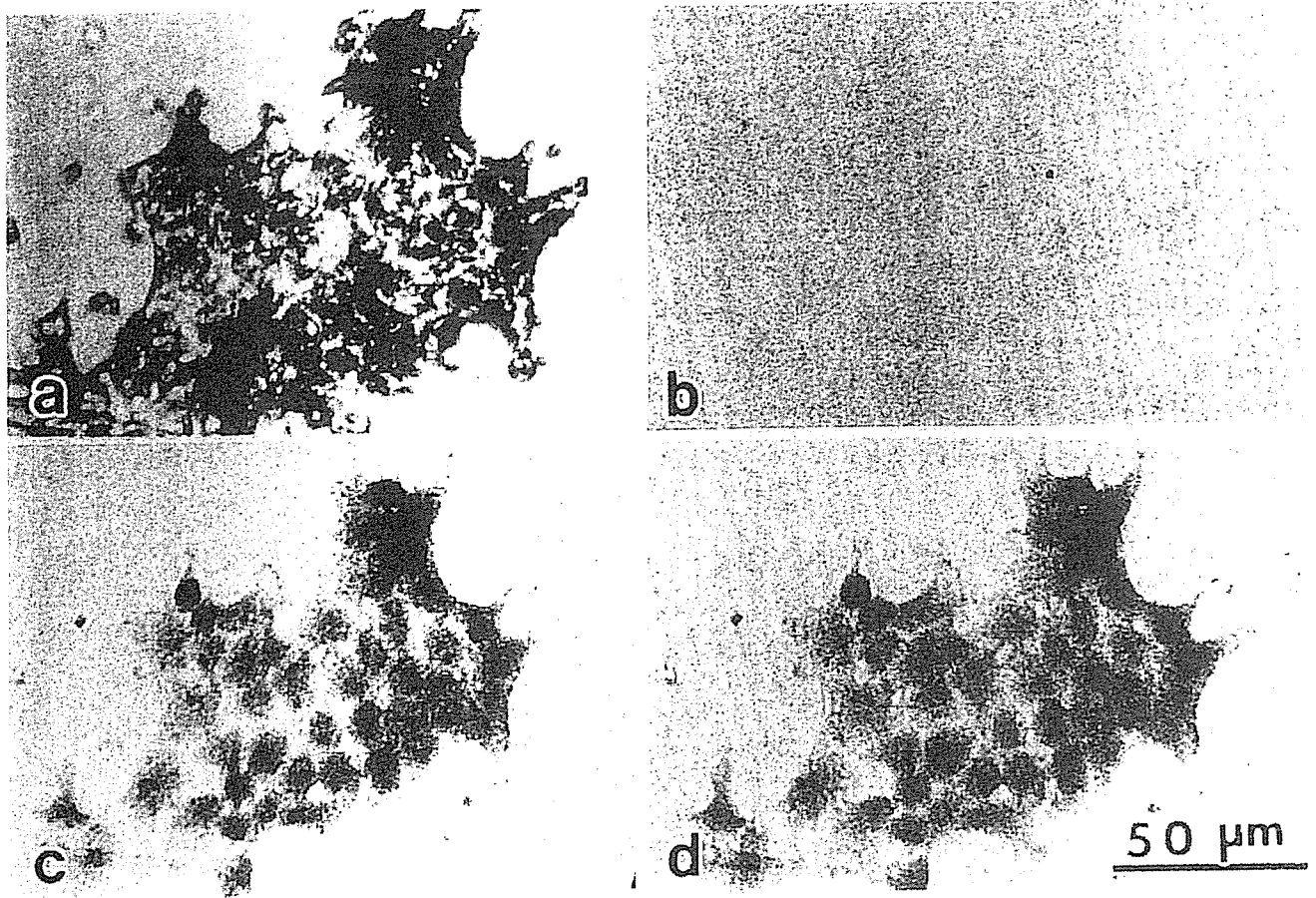


図1 フォルムバル膜上に培養された HeLa 細胞の光学像 (A) と Ge ターゲット、10kV のX線像の比較。(B) : 空气中、(C) : He 中、(D) : 真空中

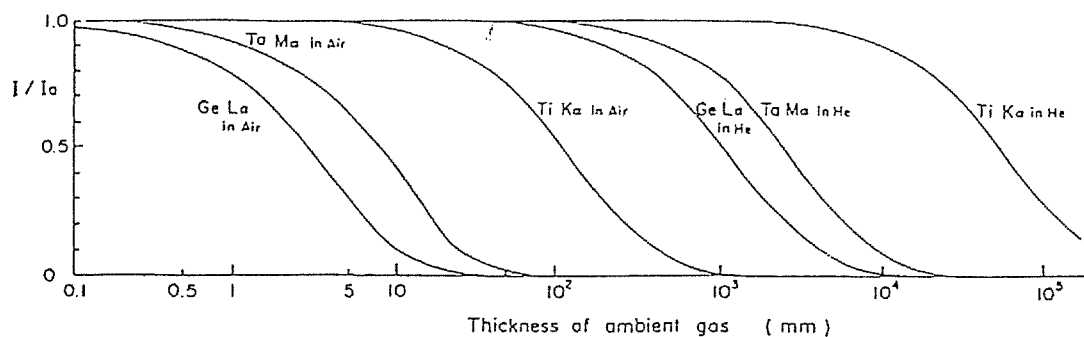


図2 空气中及びHe中でのTiK α , TaM α , GeL α 線の吸収

大きいことを利用するものである。他方、X線は軽い元素ほどよく透過するので水滴の観察はコントラストが付かず難しいと考えられてきた。これに対し、X線でも水の吸収特性（吸収端）を考慮すると、水滴にかなりのコントラストをつけることが出来るのではないかの考えから、それに適したターゲット材料の検討を行った。水滴の検出には酸素の吸収端であるK α 線2.3nmより幾分短波長のものが望ましいが、それに該当する元素はK線を考えると、F, Ne, Naで、これらは通常状態ではターゲット材料には適さない。L線ではCr, Mn, Feが考えられ、特にCrは融点が高

くターゲットとして適している。また、これらの化合物で、融点が高く密度も大きいものがあればそれもターゲットとして適していることになる。

これらのことを考慮して軽元素から成るサンプルに良いコントラストを与えるターゲットをリストアップしたのが Table1 である。水を対象にする場合は、 MgF_2 , CrF_3 , Cr が適していることが分かる。

3-2 実験装置

これらのターゲットからの特性 X 線の波長は、0.2nm-2.2nm の軟 X 線の領域にあり、図 2 に示すように空気中での吸収が無視できない。これを避けるためにターゲットから X 線の検出機までの経路内の空気を He ガスで置換する必要がある。図 3 はその状態を示すもので、X 線経路を He ガスで満たすことによって長波長成分の吸収が減衰し、真空中と同様な像が撮れることが期待される。

3-3 テスト用燃料電池の構造

用いる燃料電池の断面を図 3 に示す。原理的に

Table 1 Promising compound and element as target for samples consisting of light elements

Element to be detected	target	m. p.(c)	density	voltage(kV)
carbon	TiN	2950	5.21	5
	VN	2050	6.13	5
	Ti	1668	4.5	5
	V	1910	6.0	5
nitrogen	Ag	962	10.5	10-25
	TiO	1750	4.95	10-20
oxygen	VO	1789	5.75	10-20
	MgF_2	1263	3.15	10-20
silicon	CrF_3	1400	3.80	6
	Mg	650	1.74	10-20
	Cr	1907	7.15	10-20
	Ag_2S	825	7.23	10-20
phosphorus	Y_2S_3	1925	3.87	10-20
	Zr	1852	7.87	10-16
sulfur	MoS_2	1750	5.06	10-17
	KCl	775	1.99	10-20
calcium	Rh	1964	12.4	5-20
	Sc	1541	2.99	10-20
	Ti	1668	4.50	10-20

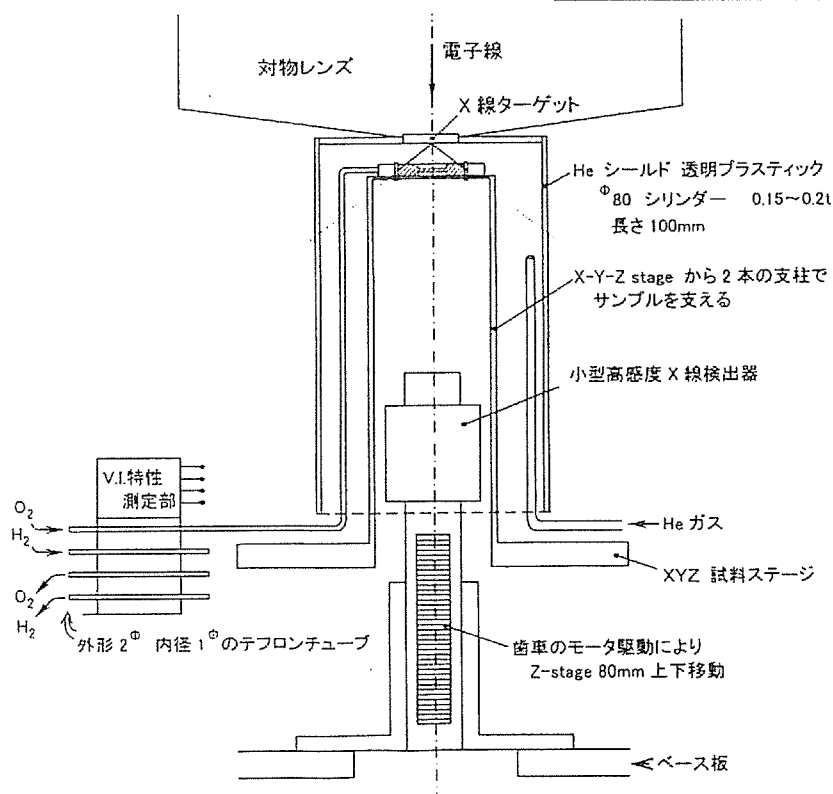


図 3 燃料電池内の水滴検出のため X 線経路を He ガスで置換する概念図

は一般に用いられているものと同じであるがX線観察に適するように、1) 動作領域は約2cm角程度で狭く、一対だけである、2) X線源側を薄くする、3) 観察窓として上下同位置に明けられた複数個の穴(2φ程度)にMylar薄膜(0.06mm)が貼られている。上述したように、このサンプルはHeガス中に置かれ、Mylar膜を透過したX線像が観察される。図4は、テスト用燃料電池の全体を示す。これは目下設計中で完成はしていないが、近く実験できる予定である。

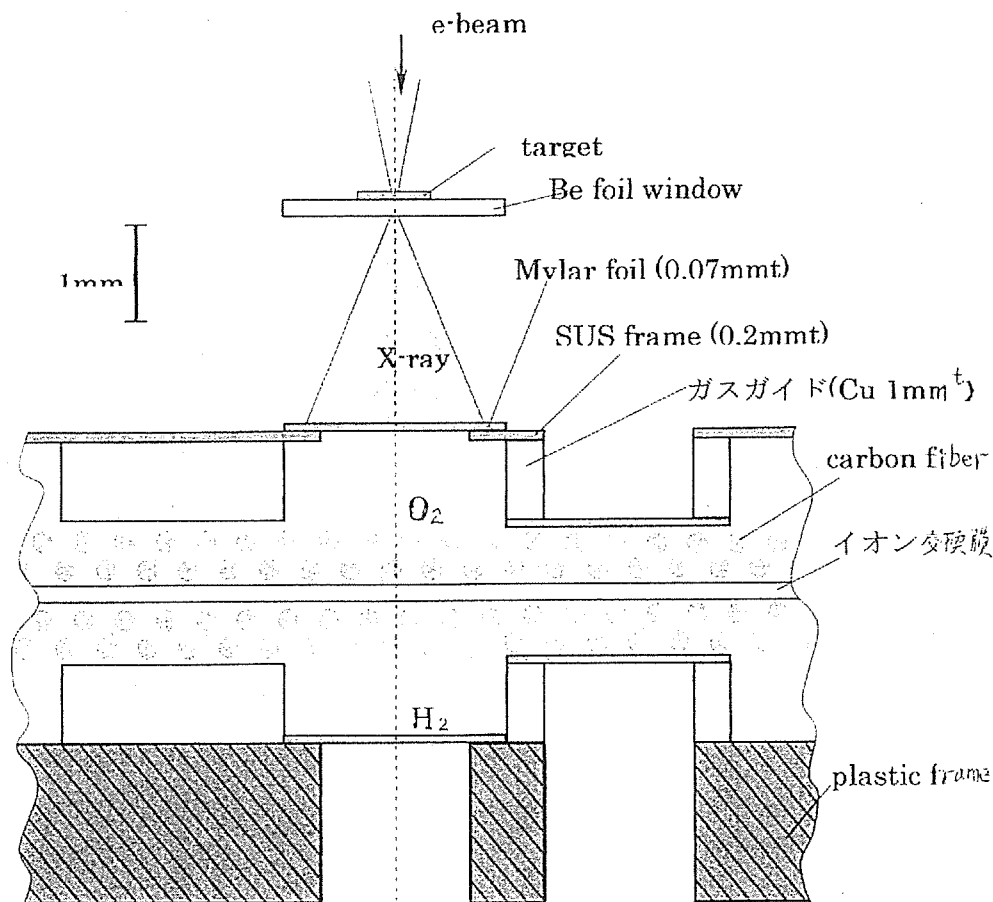


図4 テスト用燃料電池の断面図

以上、まだ準備中のことが多いが、予備実験としては、カーボン繊維の空气中、真空中、Heガス中でのX線像が撮れている。これらの結果は当日報告する。

文献

[1]Keiji Yada and Shoichi Takahasi:High Resolution Projection X-Ray Microscopy, *Multidimensional Microscopy*(ed. by P.C. Cheng et al) Springer Verlag, New York (1993) pp. 133-150

カーボンナノ物質に対する生体反応 - 生体材料への応用と生体内分布 -

北海道大学大学院歯学研究科

○ 青木尚史・山本悟・大堀ことは・横山敦郎・野田坂佳伸・赤坂司・宇尾基弘・亘理文夫

東北大学大学院環境科学研究科

佐藤義倫・田路和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

菫澤 崇

1. 緒言

カーボンナノチューブを始めとするナノ物質が、その機械的、電気的特性から多くの分野で注目を集め、一部では民生品に応用されている。生命化学分野においても、DDSや遺伝子治療における担体や生体材料として研究が進んでいる。しかし、その安全性については、最近、細胞毒性などの報告があるものの、未だ十分に明らかにされているとはいえない。我々は、数年来カーボンナノ物質に対する生体反応について、主に皮下組織での反応を組織学および超微細構造学的に検索するとともに、細胞培養用のスキャホールドへの応用についても研究を行っている。今回のプロジェクトにおいては、これらの研究をさらに進めるとともに、投与したカーボンナノ物質の生体内での分布について分析するとともに、カーボンナノ物質の生体材料への応用についても検討を行いたいと考えている。

2. 材料および方法

1) 生体適合性および生体内分解性試験

単層および多層カーボンナノチューブ (MWCNTs, SWCNTs), カーボンナノファイバー (CNFs), フラーレン (C_{60}) などのカーボンナノ物質をラット皮下に埋入し、特に長期埋入の変化について、組織学的、超微細構造学的に検索する。

2) 細胞培養用スキャホールドの開発

PTFEやPC膜にカーボンナノチューブを固定化し、骨芽細胞や骨髄細胞を培養し、増殖や形態の変化、遺伝子の発現の差違について検索する。また、チタン板に固定化したカーボンナノチューブについても同様の検索を行う。

3) カーボンナノ物質の生体内での分布

C_{60} に糖をつけ、ラットに投与し、生体内での分布をMassマッピングにより行う予定である。

4) カーボンナノ物質の生体材料への応用

PTFE膜に多層カーボンナノチューブを固定化し、GBR (Guided Bone Regeneration) 法に応用を図る。

3. 結果

1) 生体適合性試験および生体内分解性について

現在、埋入4ヶ月後まで検索しているが、MWCNTs, CNFsについて、皮下において強い炎症反応は認められなかった。CNFsについては、生体内で短縮あるいは分解された可能性が示唆されたが、MWCNTsについては、安定であった^{1, 2)}。今後1年、2年といった長期の変化について検討を行っている。

2) 細胞培養用スキャホールドの開発について

MWCNTsを固定化したPC膜上で骨芽細胞用細胞であるSaos2を培養すると、PC膜に比較し、増殖が速く、また形態も異なっていることが示された³⁾。また、骨髄細胞を用いたマイクロアレイによる遺伝子発現の差違については現在検討中である。

* 今後、ナノ物質の安全性の検討と生体への応用の2つの面から研究を進めて行きたいと考えている。

参考文献

- 1) Yokoyama, A., Sato, Y., Nodasaka, Y., Yamamoto, S., Aoki, N., Shindoh, M., Kohgo, T., Akasaka, T., Uo, M., Tohji, K., Watari, F. Tissue response to carbon nanosubstances: Comparison between carbon nanotubes and hat-stacked carbon nanofibers by transmission electron microscopy. Extended Abstracts ISETS05. 625-628, 2005
- 2) Yokoyama, A., Sato, Y., Nodasaka, Y., Yamamoto, S., Kawasaki, T., Shindoh, M., Kohgo, T., Akasaka, T., Uo, M., Tohji, K., Watari, F. Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats. Nano Letters. 5:157-161, 2005
- 3) Aoki, N., Yokoyama, A., Nodasaka, Y., Akasaka, T., Uo, M., Watari, F., Sato, Y., Tohji, K. Cell culture on a carbon nanotube scaffold J. Biomedical Nanotechnology 1:402-405, 2005