

200736020A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成20(2008)年3月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成20(2008)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発 1
亙理 文夫 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
- (研究協力者報告)
- A. 生体に投与した有機・無機粒子の体内動態のイメージング 25
阿部 薫明 (北海道大学大学院歯学研究科 助教)
- B. 生体内ナノ微粒子の高分解能電子顕微鏡観察に関する研究 46
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 准教授)
- C. ゴウリムシによるナノ微粒子の細胞毒性試験に関する研究 52
芳賀 信幸 (石巻専修大学理工学部 教授)
- D. ゴウリムシのX線顕微鏡による観察-II 59
矢田 慶治 (株式会社東研 X線開発部 技術顧問)
- E. 細胞培養におけるカーボンナノチューブ膜の影響 67
赤坂 司 (北海道大学大学院歯学研究科 助教)
- F. ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のBMP担体としての有効性に関する研究 77
川浪 雅光 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
- G. Porous poly-L-lactic acid scaffold reinforced by chitin fibres 86
Xiaoming LI (北海道大学大学院歯学研究科 日本学術振興会外国人特別研究員)
- H. (1) 正常および癌肝細胞培養におけるCNT添加の影響 96
(2) 骨芽細胞様細胞の成長に及ぼすImogolite及びCNTsスキャホールドの影響 ... 99
八若 保孝 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
- I. 生体と無機ナノ粒子のかかわりと応用に関する研究 102
米澤 徹 (東京大学大学院理学系研究科 准教授)
- J. 歯科・生体材料周囲組織中金属元素含有微粒子の形態・状態分析と金属製生体材料の生体適合性評価 107
宇尾 基弘 (北海道大学大学院歯学研究科 准教授)
- K. ヒップシミュレータ試験により発生したポリエチレン摩耗粉の形態解析 ... 113
水野 峰男 ((財)ファインセラミックセンター材料技術研究所 主席研究員)
- L. カーボンナノチューブアルミナ系複合材料に対するカーボンナノチューブの影響に関する研究 120
大森 守 (東北大学工学研究科附属エネルギー安全科学国際研究センター 研究支援者)
- M. 細胞レベルの解像度をめざした収束型電界X線源の開発 130
奥山 文雄 (名古屋工業大学工学研究科 名誉教授)

II. 分担研究報告

1. イメージング質量分析を用いた生体組織評価(2) 135
田路 和幸 (東北大学大学院環境科学研究科 教授)
2. 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— … 146
横山 敦郎 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
3. バイオ用ナノ微粒子の生体適合性におけるマクロファージ 171
遊走阻止因子(MIF)の関与に関する研究
遠山 晴一 (北海道大学病院 准教授)
4. チタン合金の体内機能劣化と微粒子生成に関する研究 176
浅岡 憲三 (徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 教授)
5. 歯科診療時に生じる切削粉の観察とそれらマイクロ・ナノ粒子の 187
体内動態可視化法の検討に関する研究
森田 学 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
6. カーボンナノチューブの植物に対する反応性の評価に関する研究 194
古月 文志 (北海道大学大学院地球環境科学研究院 教授)
7. カーボンナノチューブをコートしたシリコンラバーでの 198
細胞接着に関する研究
戸塚 靖則 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
8. (1) コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした 208
細胞培養担体の開発に関する研究と金属への応用
(2) ミクロンからナノ・オーダーへの「人工細胞外マトリックス幾何学」(2): … 221
トンネル直径の異なるハニカム型 β -TCPセラミックスの骨形成能に関する研究
北川 善政 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
9. ナノコンポジットの体内挙動検索に関する研究 227
—BMP修飾炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨形成能—
岡崎 正之 (広島大学医歯薬学総合研究科 教授)
10. ナノアパタイトの全身動態検索に関する研究 233
石川 邦夫 (九州大学大学院歯学研究院 教授)
11. 物質動的化学マッピング技術の開発 240
朝倉 清高 (北海道大学触媒化学研究センター 教授)
12. 生体観察を目指したTEMエンバイロメンタルセルの開発 248
大貫 惣明 (北海道大学大学院工学研究科 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

総括研究報告書

ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発

主任研究者 亘理 文夫 北海道大学大学院歯学研究科 教授

研究要旨

ナノ物質は高機能性を示現するとともに、刺激性も著しく昂進する可能性がある。Niのような溶解性為害材料では短・中期的に壊死・腫瘍形成、Ti・アスベストのような短期的に無害の非溶出性材料では長期摩耗粉発生や大量曝露で慢性炎症に続く骨融解や発癌性を発現するに至る。また生体防御機構が想定していなかったおよそ200nm以下のナノ微粒子は呼吸・消化器系を通して体内侵入・全身拡散する。その挙動は全身から臓器、組織、細胞レベルと単純ではなく、微細で体内で拡散して密度も低いことから検出は容易ではない。本研究ではそのスケールにより、(1)全身、(2)臓器内、(3)組織・細胞、(4)細胞内動態の4段階に分け、とりわけ代謝に関与する臓器の特定に直結する広領域全身分布表示には、新たに開発した方法も含め、体内動態を可視化し挙動を検討した。

Ti, Fe, Pt, W, TiO₂, Fe₂O₃, Fe₃O₄, CNT, ポリ乳酸等の微粒子を分散後、マウスへ尾静脈注入、一部については経口投与した。MRI法を除き開腹または切片を作製後、全身分布観察、あるいは肺・肝臓・脾臓・腎臓を摘出して臓器間比較を行い、体内循環の経時的変化を可視化した。さらにそれらの臓器の化学分析(ICP-AES)を実施し比較校正することにより、臓器内濃度・含有量と体内分布表示の定量評価を可能にした。

(1)全身動態 ①XSAM(X線走査型分析顕微鏡)元素マッピング法：収束X線プローブを照射し、試料から発光した蛍光X線をマッピングし元素分布像を得た。TiO₂では投与直後、肺に到達し、数時間から数週間かけて肝臓、さらに脾臓へ移行した。経口投与でも同様であった。粒径が小さいほど移行は早く推移する傾向を示した。Pt, Fe, Wでは投与ごく初期から脾臓に移行し、Ptの場合、化学分析との比較から投与1日後の濃度は脾臓で2000ppm、肝臓700ppmで、臓器内総含有量では肝臓に最も多量に存在した。初期投与量の40%近くが肝臓、脾臓、腎臓で検出され、以後時間の経

過とともに体内残存率は減少した。

②レーザー/マス(質量顕微鏡)法：水溶化フラーレンを投与したラットの各臓器の切片に、レーザービームを照射し蒸散した分子をマススペクトルにかけ、2次元質量分布像を得た。投与1時間後、脳からは検出されず、肝臓と腎臓から検出され、24時間後にはいずれからも検出されなかった。

③MRI法： Fe_3O_4 磁性ナノ微粒子の体内循環をきたまま経時的に3次元造影し、肝臓、腎臓への濃縮を認め、XSAM法と結果が一致した。

(2)臓器内表示 ④蛍光・光学顕微鏡法：coumarin 6で蛍光ラベリングしたポリ乳酸粒子を投与後、蛍光像・病理組織像観察を行い、肺、肝臓、脾臓、腎臓の臓器内分布像が得られた。親水化処理し分散性を改善したCNTは光顕とTEM観察から肺、肝臓、腎臓で検出された。

(3)細胞動態 単細胞個体(ゾウリムシ)を用い微粒子摂取行動・細胞内動態を連続観察し、Ag, TiO_2 , CoFe_2O_4 ナノ微粒子の作用効果を調べ、抗菌性作用機序を単純な実験系で明らかにした。

(4)細胞内動態 ⑤透過型電顕・超高压電顕法：ラット軟組織内に2年までの長期埋入したCNTの細胞内取込、ライソゾーム内での漸次的な分散化やカーボンナノファイバー(CNF)における破折断片化等の代謝過程を超高压電顕による高分解能観察を含め行った。

ナノサイジングの効果として、マクロで生体親和性を示すTiでは人工関節摩耗粉のように炎症、骨融解等を引き起こす為害性に作用が変換する。アパタイトもまた炎症やインプラント周囲の骨吸収等を起こすが、骨欠損部ではナノアパタイト-コラーゲン/コンポジットを埋入すると、破骨細胞と骨芽細胞が分化・誘導され、それらが協同的に作用してコンポジットの吸収と新生骨形成が進行し結果として骨置換性に働く。マクロではアパタイトはすぐれた骨伝導性を示すが、非骨置換性である。

生体親和性から刺激性へ、あるいは非骨置換性から骨置換性への機能性転換は、ナノサイジングにより生体反応が誘起され、炎症の発現を通してサイトカイン放出、細胞の分化誘導等、様々な生体反応を引き起こし、材料の置かれた状況に応じて生起する生物学的プロセスにより示現する効果であり、ナノテクのバイオ応用を図る上で最も基本的な知見である。

また人工股関節摩耗のシミュレーション、耐摩耗性と潤滑性を備える Al_2O_3 -CNT人工関節用材料の開発、異物磨耗粉により誘発されるインプラント周囲骨溶解のMIFほか各種サイトカインによる抑制、生体内Tiの水素脆性破断のメカニズム解析ほか磨耗粉等に起因する為害性の評価とその対策、ナノコンポジットによる硬組織再生、ナノチューブの細胞培養スcaffoldsの開発、植物細胞へのCNTの影響評価、その他の可視化手法の開発を行った。

分担研究者

田路 和幸	東北大学大学院工学研究科	教授
戸塚 靖則	北海道大学大学院歯学研究科	教授
横山 敦郎	北海道大学大学院歯学研究科	教授
戸塚 靖則	北海道大学大学院歯学研究科	教授
北川 善政	北海道大学大学院歯学研究科	教授
森田 学	北海道大学大学院歯学研究科	教授
朝倉 清高	北海道大学触媒化学 研究センター	教授
古月 文志	北海道大学大学院 地球環境科学研究院	教授
大貫 惣明	北海道大学大学院工学研究科	教授
遠山 晴一	北海道大学病院	准教授
石川 邦夫	九州大学大学院歯学研究院	教授
岡崎 正之	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科	教授
浅岡 憲三	徳島大学大学院ヘルスバイオ サイエンス研究部	教授

A. 研究目的

A1. ナノテクノロジー開発の進展

21世紀高齢社会の日本は人口減少する中で工業・輸出立国を維持し、世界における高度先進立国を引続き実現するために、ナノテクノロジーの推進は必須である。また高齢者の比率が高くなり、若年者層への介護・福祉の負担が財政的にも日常生活においても増加しつつある中で、高齢者の自立を助け、QOL (Quality of Life) を実現するためにも、ナノテクノロジーの開発と応用はきわめて重要であり、例えば抗癌剤投与や遺伝子導入に応用が期待される DDS (Drug Delivery System)

は代表的なナノマテリアルのバイオ応用例である。

A2. ナノ/マイクロ微粒子の機能性/刺激性

しかしナノ物質は高機能性を示現するとともに、刺激性も著しく昂進する可能性がある。Ni のような溶解性為害材料では短・中期的に壊死・腫瘍形成、Ti・アスベストのような短期的に無害の非溶出性材料では長期摩耗粉発生や大量曝露で慢性炎症に続く骨融解や発癌性を発現するに至る。

A3. 化学的比表面積効果と物理的微粒子サイズ効果

Ni 微粒子での腫瘍発生の現象は比表面積効果によるイオン溶出の増大効果であり、材料自体に由来する効果である。

一方、生体親和性にすぐれる Ti や粘土鉱物の 1 種アスベストでの為害性発現は単に材質が毒性か生体親和性かという特性では理解できず、微粒子自体に由来する効果が寄与していると考えられる。

マクロでの生体適合性は、イオン溶出等の化学的特性に基づき材質依存性を示すが、ミクロ/ナノ、特に 10 μ m 以下ではこれに加え、食食を誘発し炎症を引き起こす刺激性が金属・セラミック・ポリマーの種類によらず、微粒子の物理的サイズ・形状にのみ依存して顕在化する。

これは微粒子と細胞・組織との相対的なサイズの大小関係に由来し、生物学的プロセスによって非特異的に刺激性を示現する効果である。

A4. ナノ微粒子の体内侵入性

このようにミクロ/ナノ微粒子は高機能性の発現とともに刺激性も増進する可能性があるが、さらにサイズが 200nm 以下、典型的には 50nm 以下のナノ微粒子になると、呼吸・消化器系を通じて体内侵入・拡散する。

こうした材料のナノサイジングに伴う体内侵入・全身拡散挙動を明らかにするためには、微粒子の体内動態を可視化することが必要である。しかしその挙動は(1)全身から(2)臓器、(3)組織・細胞、(4)細胞内レベルと単純ではなく、微細で体内で拡散して密度も低いことから検出は容易ではない。

A5. 体内動態可視化法の開発

—微粒子動態可視化の4レベル

本研究では体内分布解析をそのスケールにより(1)全身、(2)臓器内、(3)組織・細胞、(4)細胞内

レベルの4段階に分け、可視化手法を開発/適用した(表1)。

とりわけ代謝に関与する臓器の特定に直結する広領域全身分布表示には、新たに開発した①収束X線プローブ(XSAM: X線走査型分析顕微鏡)元素マッピング法と、②レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング法を第1年度に引続き推進し、これに加え今年度は、③MRI法の適用を可能にし、全身および各レベルでの動態を可視化し挙動を検討することを主たる目的とした。

表1. 本研究で開発・解析した微粒子体内動態の4レベルと可視化手法

-
- (1)広領域(100mm程度)全身動態
- ①XSAM 元素マッピング法
(分解能 100 ~ 10 μ m)
 - ②レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング法(MALDI-TOF-MS*あるいは質量顕微鏡法→略称レーザーマス法とする)
(分解能 50 ~ 100 μ m)
 - ③MRI法
- (2)中領域(100 μ m ~ 10mm程度)臓器内表示
- 蛍光・光学顕微鏡法(分解能 1 μ m)
- (3)微小領域(10 μ m ~ 1mm程度)細胞動態
- 走査型電顕 SEM-EDS法(分解能 1 μ m)、
投影型X線顕微鏡法(分解能 0.1 μ m)
- (4)超微小領域(1nm ~ 10 μ m程度)細胞内動態
- 透過型電顕・超高压電顕法(分解能 1nm)
- (5)その他分析・検出法-放射光高感度検出
化学分析(ICE-AES)
-

* MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight Mass Spectroscopy): マトリックス支援レーザー脱離方式イオン化/飛行時間型質量分析装置

A6. 総括・分担研究の構成

これら微粒子動態と生体反応挙動を明らかにするために、本研究は大きく、(1)微粒子の体内動態の可視化とその挙動、(2)人工関節・インプラント等の臨床応用での微粒子発生とその対策、ミクロ/ナノ微粒子の生体反応性-中でも新規開発材料の(3)ナノコンポジット、(4)ナノチューブの反応性とそれに基づくバイオ応用、(5)その他の

開発途上の可視化法の研究群から構成される。その概略についてはC. 結果/C2. 総括・分担研究の梗概を、全容は各総括(研究協力者)・分担研究を参照されたい。

B. 研究方法

B1. 体内動態可視化

(1)軟組織埋入試験

ラット軟組織に1週間~最長2年間まで埋入後、病理組織像を観察した。

(2)体内動態試験

①XSAM(X線走査型分析顕微鏡)元素マッピング法:

Ti, Fe, Ni, Pt, TiO₂, CNT, ポリ乳酸等の微粒子を分散後、マウスへの尾静脈注射により血流へ直接投与、一部については経口投与した。下記MRI法を除き開腹または切片を作製後、全身分布観察、あるいは肺・肝臓・脾臓・腎臓を摘出して臓器間比較を行い、体内循環の経時的変化を可視化した。また臓器内含有量をICP化学分析し比較した。

③MRI法:

粒径11nmのマグネタイト粒子の懸濁液を吸入麻酔下、マウスへの尾静脈注射により血流へ直接投与し、体内循環を3次元造影し経時的に追跡した。測定は7 Teslaの動物用MRI(Varian社製)を用い、TR/TE = 5000/20 ms, matrix 256 x 128, FOV 80 x 40 mm², スライス厚 1mmで行った。コントラストが出やすい撮像モード・濃度依存性の造影条件の検討、臓器間移動・経時的変化のデータ取得、画像処理による投与前後の変化の情報抽出、切片試料を用いたXSAM元素マッピングによる可視化の結果との比較を行った。

④蛍光顕微鏡法:

FITCやcoumarin 6で蛍光ラベリングしたCNTおよびポリ乳酸粒子を投与後、臓器を摘出し蛍光像・病理組織像観察を行った。

B2. その他

各研究内容に関する実験方法は後出の各分担研究者、研究協力者の報告書に記載してあるので、それぞれ参照されたい。

(倫理面への配慮)

in vitro試験用の細胞は代表的なものについて

市販のものを購入、ヒト好中球、ヒト歯根膜由来線維芽細胞を用いた研究は実験に先立ち、北海道大学大学院歯学研究科・歯学部倫理委員会の承認を得て行った。動物実験は事前に関連法規*に従い、北海道大学歯学部動物実験に関する指針に基づき行った。また可能なものは *in vitro* の実験に置き換えられるよう努力した。

関連法規*：「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号及び平成11年法律第221号）」及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和55年3月27日総理府告示第6号）」

C. 研究結果

C1. 微粒子の生体反応性と体内動態

C1.1 材料と生体反応：マクロからマイクロ/ナノへ — 溶出性材料と非溶出性材料

まずマクロで有害性を示す材料(いわゆる有害性材料)と親和性を示す材料(生体親和性材料)がマイクロ/ナノへ微細化した時、生体反応性はどのように変化するかを比較して示そう。

C1.1.1 マクロ材料—組織反応

図1は有害性材料の代表としてNi(a)を、生体親和性材料の代表としてTi(b)を例に取り、インプラント大(直径1mmの丸棒)のマクロサイズ材料に対するラット軟組織の反応を示したものである(皮下埋入1週間後)。

インプラントは図1上部の中空領域にそれぞれ挿入されていた。Niでは毛細管の拡張と組織の壊死が起きており、強い有害作用を示している。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、組織反応は鎮静化しており、生体親和性に富む材料の典型的な反応である。

C1.1.2 微粒子—細胞反応

図2は各材料を微粒子にしたときの細胞(ヒト好中球)の反応のSEM像である。aはNi(0.5 μ m)、bはTi(0.5 μ m)の場合である。

Niでは強い有害性のために細胞は破壊されている。Tiでは好中球が偽足を伸ばし貪食しようとしている。この好中球をEDS(エネルギー分散型X線元素分析スペクトロスコーピー)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。

C1.1.3 微粒子—組織内長期埋入反応試験

図3はラット軟組織に長期(6ヵ月～1年)埋入後の種金属微粒子に対する反応で、aはNi(0.5 μ m)、bはTi(0.5 μ m)である。

アレルギー性のあるNi(図1a)を微粒子にし(図2a)、埋入すると直後から強い反応を惹起し炎症性細胞浸潤を引き起こす。1ヵ月後には周囲組織は壊死し、壊死層の周囲に強い細胞浸潤層、さらに炎症層が形成され、1年後には組織に腫瘍の発生を認め遺伝子レベルでの強い傷害が生じた(図3a)。

一方、生体親和性にすぐれるTi(図1b)では3 μ m～500nmの微粒子に対して、細胞レベルでは貪食(図2b)、組織レベルでは炎症を引き起こし、長期慢性的な炎症反応を示す間に細胞内濃縮を繰返し、次第に凝集し、やがて1年後には線維性結合組織で周囲を覆われ粒子群として凝集した(図3b)。しかし周囲に取りこぼしがあり、炎症は長期間持続した。

C1.2 ナノ微粒子の刺激性と体内侵入

C1.2.1 ミクロ/ナノ微粒子の刺激性

図4はマイクロ/ナノ微粒子の生体反応性を *in vitro* 細胞機能性試験で定量的に調べた結果で、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サイトカインTNF- α の産生を示したものである。

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。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。

(I)ミクロ～サブミクロン領域

TNF- α は炎症性反応の程度を示す最も代表的な指標の一つで、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、産生は徐々に増加するが、特に10 μ mを切ると急激な増大を示している。

この時起きている現象を観察したものが図2bであり、HBSS溶液中で好中球には微粒子の貪食が誘発されている。こうした好中球による貪食像は3 μ m以下の粒子でのみ観察され、10 μ m以上の粒子では観察されなかった。

サイトカインIL-1 α や活性酸素でもTNF- α と同様、10 μ m以下の粒子で急激な発現増加を示

した。TNF- α の急激な放出増大は、図2bに示された $3\mu\text{m}$ 以下の粒子でのみ観察された好中球の貪食作用に非常によく対応している。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。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ことを表している。TNF- α の産生はIL-1 β に比べ、その変化の程度がより急激であり、貪食作用に密接に関連しているものと考えられる。

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。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と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。

上記の細胞機能性試験を他の金属微粒子についても行うと、溶解度等の化学的性質は異なるが比較的良好な生体適合性を示すFeでもTiと同様な傾向が得られた。Ti, Fe等の金属、TiO₂, CNT等のセラミックス、ポリ乳酸等の高分子のいずれでも、微粒子サ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し、この傾向は $10\mu\text{m}$ 以下で増幅されることがわかる。bioactive, bioinertな特性を有する材料共通にこのような現象が認められ、材料に非特異的に起きる効果であることがわかる。一方、Niのように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、その為害性は著しく強くなり、異なる挙動を示した。

(2)サブミクロン～ナノ領域

図3に示した細胞機能性試験を微粒子サイズがサブミクロンよりもさらに小さいnm領域まで行った。金属Tiは $0.5\mu\text{m}$ 以下になると容易に酸化し微粒子として大気中下で扱うのは困難であり、さらに小さいものにはTiO₂を用いた。材質に依存しない物理的サイズ効果を反映し、その絶対値レベルは $2\mu\text{m}$, $0.5\mu\text{m}$ で見るとわかるように、金属Tiとあまり変わらない。TNF- α 産生で示される刺激性は微粒子サイズが細胞と同程度(約 $10\mu\text{m}$)以下になると刺激性が昂進し、 μm 前後～ $0.5\mu\text{m}$ 付近でピークを示し、 200nm 付近以下になるとむしろ低下し、 50nm TiO₂ではかなり低いレベルになる。

C1.2.2 ナノ微粒子の体内侵入・全身拡散

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。以下に示すように、 30nm のTiO₂粒子を用い、ラットに対して呼吸器系への強制曝露試験を行うと、呼気によって肺胞に到達し、病理組織像から炎症を惹起し、粒子の追跡から肺胞から血中へ移行することが認められ、さらに体内全身のXSAM元素マッピングにより、全身拡散と臓器への濃縮が観察される。また経口摂取によっても同様に体内に取込まれ、臓器への濃縮が起きることを確認した。典型的には 50nm 以下のナノ粒子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とも考えられ、体内への侵入が起こり得ることを示すものである。

C1.3 ナノ微粒子の体内動態の可視化

C1.3.1 微粒子動態可視化の4レベル

顕微鏡/イメージングの分解能と視野スケールは一般に相反する要求性能である。どの臓器に微粒子が拡散移行し捕捉濃縮されるかを確認するには全身レベルでの観察範囲が必要であり、最も小型の実験用哺乳類動物のマウスを用いたが、それでも 100mm オーダーのサイズになる。一方、細胞に貪食された微粒子の細胞内挙動を観察するには μm 以下の領域の観察と nm オーダーの分解能が必要である。こうしたニーズに対応するために、本研究ではそのスケールにより、

- (1)広領域(100mm 程度)全身動態
 - (2)中領域($100\mu\text{m}\sim 10\text{mm}$ 程度)臓器内表示
 - (3)微小領域($10\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ 程度)細胞動態
 - (4)超微小領域($1\text{nm}\sim 10\mu\text{m}$ 程度)細胞内動態
- の4段階のレベルで、それぞれに適した顕微鏡/イメージング法を開発または活用し、以下のように可視化を実現した。

C1.3.2 微粒子動態のイメージング

(1)広領域(100mm 程度)全身動態—<主要開発内容>

①収束X線プローブ元素マッピング—XSAM(X線走査型分析顕微鏡)元素マッピング法:

収束X線プローブを照射し、試料から発光した蛍光X線をマッピングし元素分布像を得た。

①-1 呼吸器系

図5は強制曝露試験による呼吸器系からのナノ微粒子の体内侵入/全身拡散を可視化したもので、ラット体内の全身Ti元素分布像である。気管支、

肺、肝臓、膀胱に 30nmTiO₂ 粒子が集積していることが見て取れる。

①-2 消化器系

図 6 は消化器系からのナノ微粒子の体内取込/全身拡散の例である。30nmTiO₂ 粒子を 10 日間投与後の脾臓からの X 線元素分析で Ti が検出されており、消化器系から体内摂取されていることがわかる。

①-3 尾静脈からの血流への直接注入

①-3.1 体内分布の経時的变化

図 7 は尾静脈注入後の体内動態で、30nmTiO₂ 粒子は肺から肝臓、脾臓へと移行している。

①-3.2 体内動態の微粒子材質依存性

図 8 は微粒子の臓器間移行の経時的变化の材質依存性を示したもので、TiO₂ および Pt の場合である。各時間における臓器間での相対的な存在率として表示している。TiO₂ では投与直後、肺に到達し、数時間から数週間かけて肝臓、さらに脾臓へ移行した。Pt では投与直後から優先的に脾臓に到達・滞留している。Fe, W でも Pt と同様な挙動を示した。

①-3.3 体内動態の微粒子サイズ依存性

図 9 は TiO₂ 粒子の臓器間移行の微粒子サイズ依存性で、微細粒子では移行が早く進展する傾向が見られる。

①-3.4 XSAM マッピングの定量性—化学分析による比較校正

図 10 は Pt 微粒子投与 1 日後のマウス各臓器 (a) の Pt 元素マッピング像 (b) で、脾臓で高濃度に検出され、肝臓がこれに次ぐ。

図 11 は化学分析(ICP-AES)による投与 1 日後、各臓器に含まれる Pt 濃度 (a)、および Pt 総量 (b) である。脾臓に Pt は最も高濃度に存在しており、図 10 b の XSAM マッピング像の結果と一致している。また臓器内に含まれる Pt 総量は肝臓で最も多い。

②レーザーアブレーション/マスペクトルマッピング(レーザーマスあるいは質量顕微鏡)法:

水溶化したフラーレン(C60)を投与したラットの各臓器の切片に、レーザービームを照射し蒸散した分子をマスペクトルにかけ、2次元質量分布像を得た。

フラーレンは脳からは検出されず、肝臓と腎臓から検出された。

図 12 は水溶化フラーレン投与 1 時間後のラット各臓器中の C60 のレーザーマス法イメージングの結果で、a は脳、b は腎臓、c は肺、d は肝

臓のそれぞれ投与前、投与後のマッピング像である。また e, f は肝臓全体のそれぞれ d 上、下図に対応する投与前、投与後の肝臓全体からのマスペクトルである。マッピング像では腎臓にわずかに、肝臓により多く検出され、スペクトルでは質量 $M=C60=12 \times 60=720$ 付近にピークが認められる。フラーレンの質量は水溶化表面処理のため、C60 から多少ずれがある。なお今回は脳からは検出されなかった。脳には脳脊髄関門を通過して到達しているか否かの結論は今後さらに実験を積み重ねる必要がある。

図 13 は水溶化フラーレン投与 1 時間後のラット腎臓の C60 のレーザーマス・マッピング像 (左) と腎臓内の 1 点からのマスペクトル (右) を示したものである。マッピング像から、臓器内での部位による濃度の変動と、スペクトルから腎臓内の局所 1 点からおよそ C60 に対応する分子片の存在が検出同定された。

なお投与 24 時間後にはいずれの臓器からもフラーレンは検出されなかった。フラーレンはすみやかに体外に排出された可能性が高いと考えられる。

③MRI 法:

MRI によりナノ微粒子の体内動態を生きのまま 3 次元的に可視化し、同一個体で経時変化を追跡することを試みた。MRI の適用には磁性ラベリングが必要であるが、ここでは平成 14~16 年度に実施された厚労科研費研究で、癌のハイパーサーミア治療(高周波誘導温熱療法)用に開発された酸化鉄(マグネタイト Fe₃O₄) ナノ微粒子を対象として行った。

図 14 はマグネタイトナノ微粒子の尾静脈注入による投与前、投与 1 週間後のマウスの MRI 像。両者のコントラストの差異の比較から肝臓に濃縮していることがわかる。同様に腎臓への移行も認められた。また投与前後の差異をより明瞭に示すために、画像処理を試みた。

(2)中領域(100 μ m ~ 10mm 程度)臓器内表示

④蛍光・光学顕微鏡法(分解能 1 μ m):

FITC や coumarin 6 で蛍光ラベリングした CNT およびポリ乳酸粒子を投与後、蛍光像・病理組織像観察を行った。

図 15 は蛍光(クマリン)ラベリングしたポリ乳酸微粒子の尾静脈注入投与 1 週間後のマウスの各臓器内分布を示す蛍光顕微鏡像である。それぞれ a は肺、b は脾臓で、ほかに肝臓からも蛍

光スポット像が得られている。大きさから見て各スポットは1個のポリ乳酸微粒子に近い。粒子同士であまり凝集することになく、拡散、捕捉されているように思われる。臓器内組織との対応が必要である。

(3)微小領域(10 μ m ~ 1mm 程度)細胞動態

④蛍光・光学顕微鏡法(分解能1 μ m):

単細胞個体(ゾウリムシ)を用いて微粒子摂取行動・細胞内動態等を連続観察し、各種微粒子の細胞毒性とその作用機序を解析した。

単細胞個体(ゾウリムシ)は *in vitro* と *in vivo* の接点に位置し、*in vivo* の最も単純な素過程を観察できる実験系とも位置付けられ、生きたまま行動パターンと細胞内動態を経時的に観察でき、さらに分裂・増殖後の子孫の代まで観察可能な点できわめてユニークで興味深い実験系である。

今回は Ag, TiO₂, CoFe₂O₄ ナノ微粒子の作用効果を調べ、抗菌性の発現に神経細胞系、生殖細胞系のいずれに作用するか判定、特に抗菌性効果の高かった Ag 粒子で細胞表面から可溶性、速効性致死因子として作用することが示された。

またヒトマクロファージ様細胞(THP-1)を用いた *in vitro* 試験で、FITC で蛍光ラベリングした CNT の貪食を確認した。

(4)超微小領域(1nm ~ 10 μ m 程度)細胞内動態

⑤透過型電顕・超高压電顕法

親水化処理した CNT を尾静脈注入後、透過型電顕観察により肺、肝臓、脾臓、腎臓から CNT の凝集体が観察された。

またラット軟組織内に埋入した CNT の細胞内取込、ライソゾーム内での漸次的な分散化やカーボンナノファイバー(CNF)における破折断片化等の代謝過程を超高压電顕による高分解能観察を含め行った。

C1.4 CNTの細胞培養スカフォールドへの応用

現在まで CNT の特性を調べ、生体親和性にすぐれ、様々な興味深い現象を見出している。その一つに CNT 上で培養した際の細胞付着性・伸展性がある。図16は CNT スカフォールドに細胞が接着し、細胞末端から糸状仮足を長く張り出し、結合している例で、(a)はヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 SaOs2、(b)はラット副腎髄質褐色細胞腫由来神経細胞 PC12 の場合である。骨芽細胞様細胞では細胞が付着しにくいシリコーンゴム上で CNT をコーティングすると細胞の付着・伸展

性が著しく改善され、そうした細胞末端の一部位を強拡大したものが図16aである。神経細胞 PC12 は接着性はあまり強くない細胞であるが、CNT へ向けての糸状仮足の伸展が観察される。

C1.5 アパタイトのナノサイジング効果

さてアパタイトが微粒子になればどのような影響をもたらすであろうか。

C1.5.1 マクロサイズにおける機能性

図17はアパタイトコーティングチタン・デンタルインプラントである。

マクロサイズではアパタイトは生体親和性に富み、すぐれた骨伝導性を示し、周囲に新生骨形成を誘導する。しかしそれ自体は骨に置き換わることはない。したがってマクロサイズでは図17のように体内に永久に存在するインプラントとして用いられるのに適している。しかし骨組織への変換を期待する歯周組織や骨欠損部への適用はあまり効果がないと思われる。

C1.5.2 ミクロ/ナノ効果(1)

もし微細なアパタイト粉末がある場合には、他の bioactive, bioinert 材料と同様、物理的サイズ効果により、貪食と炎症を誘発して破骨細胞や巨食細胞の分化・誘導により骨吸収を起こす。

図18はそうした効果の典型例で、アパタイトコーティングチタン・デンタルインプラントの臨床適用失敗例である。なんらかの理由で、アパタイトコーティング膜が剥離、または破折断片化し、ダストが発生して周囲に拡散・散在すると、上記の貪食、炎症を誘発しインプラント周囲の新生骨吸収を導き、失敗に至る。

C1.5.3 ナノアパタイトからなる天然骨

しかしながら我々の骨や歯はナノアパタイトから構成されている。図19はアパタイトの2種の存在形態を示した SEM 像で、aは焼結後の合成アパタイト、bは天然歯(ラット犬歯エナメル質)の場合である。50 μ m 程度のエナメル小柱がc軸方向に揃った約 50nm のナノアパタイト結晶子の集合組織からなることがわかる。

天然骨ではリモデリングにより常に骨吸収と形成のプロセスを繰り返している。骨は構造的にはコラーゲンに析出したナノアパタイトからなる複合材料と捉えることができる。

図20は合成アパタイトの粒子形態を示した SEM 像で、コラーゲン共存下で作製すると粒子サ

イズが著しく小さくなり 50nm 程度になっている。

C1. 5. 4 ミクロ/ナノ効果(2)ー機能的転換

図 2 1 は骨組織を模倣したナノアパタイト-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 2 週後の組織像である。ナノコンポジット部(黒*)が吸収されるとともに、これに隣接して骨細胞を含む新生骨(白*)が不可分に形成されている。このプロセスは経時的にさらに進行するために、やがて骨に置き換わる。ここでは破骨細胞と骨芽細胞が現れ協同的に作用して、コンポジットの吸収と新生骨形成が隣接して進行し、結果として骨置換性が達成されている。

C2. 総括・分担研究の梗概

各研究タイトル後尾(記号・主著者)中の記号は目次に記された記号であり、詳細は各報告を参照されたい。

C2. 1 微粒子体内動態可視化

C2. 1. 1 全身動態

C(1) 生体に投与した有機・無機粒子の体内動態のイメージング(I.A. 阿部)

尾静脈注入による全身動態を XSAM 法を中心に可視化し、さらに ICP 化学分析と比較して経時変化と材質・粒度依存性を調べ、定量的な評価も行った。また新たに MRI 造影法による連続観察を開始し、蛍光顕微鏡、電顕で臓器内分布を可視化した。

C(2) イメージング質量分析を用いた生体組織評価(2)(II.1. 田路)

フラーレンをイメージング媒体としたレーザー/マス(MALDI-TOF-MS あるいは 質量顕微鏡)法を開発し、水溶化処理フラーレン投与後の全身および臓器内からの検出、分布表示を行った。

水溶化フラーレンを尾静脈注入後、臓器を摘出し、レーザー/マス法で観察すると、1 時間後、肝臓でのみ検出され、脳、肺、脾臓では検出されなかった。また 24 時間後ではいずれの臓器でも検出されなかった。比較的短時間で体外に排出される可能性が示された。

C(3) カーボンナノ物質に対する生体反応ー生体材料への応用と生体内分布ー(II.2. 横山)

MWCNT(多層カーボンナノチューブ)および

CNF(カーボンナノファイバー)のラット皮下軟組織への長期埋入試験を行った。最長 2 年までの試験でも壊死や変性などの強い炎症反応は生じなかった。マクロファージのライソゾーム内取込と起炎性は、CNT の結晶構造とサイズに依存し、CNT よりも CNF のほうが、またナノチューブ長が短いほど低かった。ライソゾーム内に取込まれた CNT は次第に凝集性が減少し、CNF では破折断片化が進行し、ともにある種の生分解が進行した。

水溶化フラーレンを尾静脈注入 1 および 2 4 時間後、臓器を摘出し、レーザー/マス法で観察し、フラーレンの存在の有無を確認した。

以上から、カーボンナノ物質の体内における安全性と生体材料としての応用の可能性が示唆された。

C(4) 生体と無機ナノ粒子のかかわりと応用に関する研究(I.I. 米澤)

各種ナノ微粒子を作製し供給するとともに、特に新たに作製した白金ナノフラワーは MALDI-TOF-MS 分析で高感度検出性を示した。

C(5) 歯科診療時に生じる切削粉の観察とそれらマイクロ・ナノ粒子の体内動態可視化法の検討に関する研究(II.5. 森田)

歯科診療時に生じる切削粉の使用切削バー/研削ポイント依存性と被削体材質依存性を調べ、また体内動態の MRI 観察を行った。

C2. 1. 2 単細胞個体(ゾウリムシ)の摂取行動・細胞内動態ー微粒子の単細胞個体の行動パターンと細胞内動態に及ぼす影響

単細胞個体(ゾウリムシ)は in vitro と in vivo の接点に位置し、in vivo の最も単純な素過程を観察できる実験系とも位置付けられ、生きたまま行動パターンと細胞内動態を経時的に観察でき、さらに分裂・増殖後の子孫の代まで観察可能な点できわめてユニークで興味深い実験系である。

C(6) ゾウリムシによるナノ微粒子の細胞毒性試験に関する研究(I.C. 芳賀)

今回は Ag, TiO₂, CoFe₂O₄ ナノ微粒子の作用効果を調べ、神経細胞系および生殖細胞系という細胞機能に対する抗菌性作用機序を単純な系で迅速明快に判定できることが示された。特に Ag 粒子は可溶性、速効性致死因子として細胞表面から作用していることが示唆された。

TiO₂ および CoFe₂O₄ 粒子では、分裂期および分裂停止期の細胞に対する毒性はなかったが、有性生殖過程の細胞には核形成への影響が認められた。

C(7) ゾウリムシのX線顕微鏡による観察-II (I.D. 矢田)

新たに投影型X線顕微鏡を適用することにより、細胞形態を光学顕微鏡およびSEM像と比較併用してゾウリムシの形態の高解像度像出を可能にした。

C2. 1. 3 細胞内動態の高分解能観察と画像処理による情報抽出

C(8) 生体内ナノ粒子の高分解能電子顕微鏡観察に関する研究 (I.B. 坂口)

コントラストがつきにくく小口径対物鏡を用いて低分解能、高コントラストをめざす生体組織像と、大口径鏡を用い必然的に低コントラスト下で結晶構造の高分解能観察をめざす材料観察とは相反する観察条件である。生体組織内ナノ粒子(CNT)の高分解能観察を可能にするために、超高压電子顕微鏡を用いることにより実現した。しかし生分解作用により崩壊しつつある結晶構造はコントラストはなお低く、これを改善するために、画像処理を行って必要な情報抽出を行い、より明快なイメージング像として像出することを試みた。

C2. 1. 4 組織内微粒子—放射光高感度検出と電顕構造解析

C(9) 歯科・生体材料周囲組織中金属元素含有微粒子の形態・状態分析と金属製生体材料の生体適合性評価 (I.J. 宇尾)

歯科用インプラントおよび人工関節の周囲組織に見出される微粒子の臨床例や体内腐食で生成が予想される水素吸蔵脆化 Ni-Ti, SUS316L について、放射光 XAFS(X線吸収微細構造)測定による高感度検出同定、金属/酸化物等の状態分析と電顕構造解析を行い、微粒子の形態と状態を評価した。

C2. 2 人工関節、インプラント、補綴物からの微粒子発生と対策

C2. 2. 1 微粒子の体内生成

C(10) チタン合金の体内機能劣化と微粒子生成に関する研究 (II.4. 浅岡)—水素化物生成の影響 Ni-Ti 合金は形状記憶、超弾性特性をもつこと

から、歯列矯正ワイヤー、カテーテル、ステント等、歯用・医用材料として口腔内、体内で用いられている。一方、臨床ではしばしば破折例も報告されている。従来、その機能性のみ注目され、容易に起きる水素侵入性と水素吸蔵性、およびこれに伴う水素脆性には注意が払われてなかった。体液中の腐食性環境や腫瘍・粘膜疾患による pH の変化等、体内での使用環境に近い種々の応力、ひずみ負荷条件下で水素をチャージし、腐食挙動を調べた。機械的特性の劣下とともに表面腐食生成物からマイクロ/ナノ微粒子が生成、周囲組織に分散し、疾患の発症に関わる可能性が示された。

C2. 2. 2 人工関節摩耗粉の評価と対策

股関節等の人工関節から発生した摩耗粉は周囲組織に炎症、引続き骨吸収を誘発して、事実上、人工関節の使用寿命を決めてしまう点で、重要な問題である。

C(11) ヒップシミュレータ試験により発生したポリエチレン摩耗粉の形態解析 (I.K. 水野)

臨床に近い条件で摩耗試験を行うヒップシミュレータを用いて、人工関節カップ側摺動面に用いられる高強度ポリエチレン(UHMWPE)の摩耗性状、摩耗量、タンパク質量の異なる牛血清依存性、摩耗粉形態等を解析した。

C(12) カーボンナノチューブ—アルミナ系複合材料に対するカーボンナノチューブの影響に関する研究 (I.L. 大森)

摩耗粉抑制の対策として、耐摩耗性は高いが脆性材料であるアルミナにカーボンナノチューブを加え、放電プラズマ焼結(SPS)で複合材料を作製した。肉薄多層カーボンナノチューブに比べ、肉厚多層カーボンナノチューブを使用した場合には、破壊強度、破壊靱性とも市販のアルミナ製品よりも向上し、潤滑性も付与可能である。

C(13) バイオ用ナノ粒子の生体適合性におけるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)の関与に関する研究 (II.3. 遠山)

人工関節摩耗粉に由来する骨吸収発現メカニズムのモデル実験として、マウス頭頂骨へのTi微粒子埋入試験を行った。破骨細胞の増加を伴った骨吸収の亢進と、MIF, TNF- α , IL-1 α , IL-6, RANKLの骨吸収性サイトカインの遺伝子発現の増加が認められた。マクロファージ遊走阻止因

子(MIF)は IL-1 や TNF- α などのサイトカインカスケードの上流に位置し、異物微粒子による骨吸収を発現させる炎症性サイトカインカスケード上で重要な役割を担っていることが示された。

C2.3 ナノコンポジットによる組織再生

C(14) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の BMP 担体としての有効性に関する研究 (I.F. 川浪) - 歯周組織再生に向けて

歯周組織再生のために有力な方法として BMP 投与があるが、象牙質面で硬組織形成に隣接して吸収も昂進する。その対策としてナノアパタイト-コラーゲン/コンポジット薄膜を作製し、架橋剤種依存性、BMP 投与有無による骨形成への影響を調べ、BMP 担体としての効果が確認された。

C(15) Porous poly-L-lactic acid scaffold reinforced by chitin fibres (I.G. LI)

ポリ乳酸(PLA)は生分解性であるが、分解して酸性になるため、臨床使用時にはしばしば炎症を生ずる。キチン質繊維を添加し架橋を行ったスカフォールドを作製した。強度が増大するとともに、キチンは分解してアルカリ性になり、ポリ乳酸の分解物を中和し、生体親和性が向上する。この発展として作製したキチン質繊維強化ナノアパタイト/コラーゲン/ポリ乳酸コンポジットでは、ヤギシャンク骨欠損モデル実験で、ギャップ長 40mm 以上の骨欠損部の再生が可能であった。

C(16) ミクロンからナノ・オーダーへの「人工細胞外マトリックス幾何学」(2): トンネル直径の異なるハニカム型 β -TCP セラミックスの骨形成に関する研究 (II.8. (2) 久保木)

骨組織再生に最適な人工の細胞外マトリックス (ECM) の 3次元幾何構造を調べるために、ハニカム構造の β -TCP を作製し、BMP 誘導による異所骨形成能実験を行った。最適トンネル直径値は 75 μ m で、不規則貫通孔構造のヒドロキシアパタイトブロックにおける 300-400 μ m とは異なり、材質・トンネル形状依存性があることが示された。

C(17) ナノコンポジットの体内挙動検索に関する研究 - BMP 修飾炭酸アパタイト-コラーゲンスカフォールドの骨形成能 - (II.9. 岡崎)

周囲を多孔性アパタイト・フレームでハイブリッド化し強化した多孔性炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジスカフォールドは、100-300 μ m の

貫通孔を有し、細胞の遊走が良好で、3次元細胞培養が可能であった。骨増殖因子 rhBMP2 を添加すると骨再生がさらに促進され、硬組織再生用生体材料として有望と考えられる。

C(18) ナノアパタイトの全身動態検索に関する研究 (II.10. 石川)

ナノ炭酸カルシウムブロックをリン酸アンモニウム水溶液に 60 $^{\circ}$ C で浸漬することにより、マクロブロック形態を保持したまま、ナノ炭酸アパタイトへの変換が実現できた。その上で破骨細胞を培養すると吸収窩が認められ、骨欠損部埋入でリモデリングを受け、骨置換材料として働く可能性が示された。

C2.4 ナノチューブのバイオ応用開発

C(19) 細胞培養におけるカーボンナノチューブ膜の影響 (I.E. 赤坂) - カーボンナノチューブ・スカフォールドの細胞の分化・増殖に及ぼす影響

ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (SaOs2) を各種カーボンナノチューブからなる薄膜上に播種すると、接着細胞数は細胞培養用ディッシュに対し、単層カーボンナノチューブ (SWNTs, 0.9 倍)、多層カーボンナノチューブ (MWNTs, 1.3 倍) であり、また細胞増殖は SWNTs (1.2 倍)、MWNTs (0.8 倍) といずれも良好な細胞接着・増殖性を示した。特に低血清培地を用いた場合、SWNTs は顕著な増殖促進効果 (3.3 倍) を示し、MWNTs も (1.0 倍) と良好であった。

C(20) 正常および癌肝細胞培養における CNT 添加の影響 (I.H. (1) 八若)

ヒト正常肝細胞由来 HC 細胞とヒト癌肝細胞由来 HepG2 細胞および両者の共培養系に対して、CNT 添加の影響を比較した。CNT は正常細胞には付着するが、癌細胞へはほとんど付着せず、細胞数は著しく減少した。

C(21) 骨芽細胞様細胞の成長に及ぼす Imogolite 及び CNTs スキャホールドの影響 (I.H. (2) 八若)

粘土鉱物の 1 種のナノチューブである Imogolite スカフォールド上に、骨芽細胞様細胞 (SaOs2) を培養すると、SWCNTs スカフォールドとほぼ同等な細胞数と形態を示し、cell culture dish と比較すると、ナノチューブ上の細胞は形態が多様で、分化に有利であると考えられた。CNT が黒色で審美性に難があるのに対し、白色で歯科応用には有利である。

C(22) カーボンナノチューブの植物に対する反応性の評価に関する研究(II.6. 古月)

「植物が介入したナノ素材の生態系への拡散・侵入」効果を洞察するために、植物培養細胞(シロイヌナズナ T87、イネ培養細胞 OS-1、タバコ培養細胞 BY-2)を用い、CNT 添加による影響を調べた。細胞増殖率、細胞生存率とも影響はカーボンブラックよりも低く、アスベストよりきわめて低い。イオン溶出や触媒活性のような化学的効果よりも、物理的効果がより大きく作用すると考えられる。

C(23) カーボンナノチューブをコートしたシリコーンラバーでの細胞接着に関する研究(II.7. 戸塚)

撥水性で細胞接着性の低いシリコーンゴムに対して、CNT をコーティングすることにより、細胞付着性・伸展性が改善され、生体親和性を改善することができた。

C(24) コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした細胞培養担体の開発に関する研究と金属への応用(II.8.(1)北川)

コラーゲンコートディッシュに、カルボキシル化後、界面活性剤で分散させた CNT をコーティングし新しい細胞培養担体を開発した。透光性で培養細胞の顕微鏡観察が可能であり、ラット線維芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を用いた培養試験では、細胞活性、細胞増殖率ともにコラーゲンに比べ遜色なく、またトリプシン EDTA による剥離が困難で高い細胞付着能を示した。また Ti にコラーゲンをコートした上にさらに CNT をコートすることにより、CNT コーティング Ti インプラントを開発し動物埋入試験も行った。

C2.5 その他の可視化手法の開発

C(25) 細胞レベルの解像度をめざした収束型電界 X 線源の開発(I.M. 奥山)

カーボンナノチューブを電界放射電子源とする電界 X 線源の開発に向けて検討し、電磁収束を採用することにより、約 50 μ m の焦点径および解像度が得られ、さらに 1~5 μ m の解像度まで改良可能であることが示唆された。将来的には X 線照射内視鏡等への応用開発も考えられる。

C(26) 物質動的化学マッピング技術の開発(II.11. 朝倉)ー光電子顕微鏡の開発

Wien filter を搭載しエネルギー分解能が高い X 線光電子放出顕微鏡 (EXPEEM) を開発し、

さらに高感度化に取り組んだ結果、表面化学状態の分析とそのエネルギー選別 2次元分布像の像出が可能になった。また、ノンコンタクト法原子間力顕微鏡(NC-AFM)と放射光を組み合わせ、原子レベル元素マッピングが可能になる X 線励起走査探針顕微鏡 (XANAM) の開発を行った。

C(27) 生体観察を目指した TEM エンバイロメンタルセルの開発(II.12. 大貫)ー雰囲気可変電顕観察

大気または水蒸気環境観察も可能な TEM 用密閉型環境セルを開発し、水素雰囲気中で Mg-Nb₂O₅ 粉末の水素化反応をその場観察し、その変化を追跡した。

D. 考察

D1. 各種イメージング法の原理と特徴

微粒子体内動態を可視化するために、本研究では新たな顕微鏡観察法/イメージング法の開発と従来型顕微鏡の拡張適用を行い、その他にも新型顕微鏡の開発も進めている。表 2 はそのリストである。

表 2. 微粒子の体内動態可視化のために、開発または使用した顕微鏡/イメージング法

X線走査型分析顕微鏡(XSAM)
投影型 X線顕微鏡
質量顕微鏡(MALDI-TOF-MS イメージング法)
SEM
TEM
超高压電子顕微鏡(1250kV)
エンバイロメンタルセル TEM
光学顕微鏡
蛍光顕微鏡
X線光電子放出顕微鏡 (EXPEEM)
X線励起走査探針顕微鏡 (XANAM)
MRI
CNT 電界放出電子源励起電磁収束型 X線源
ほかに、分析・検出法として
放射光高感度検出分析/XAFS(X線吸収微細構造)
化学分析(ICE-AES)

(1)広領域(100mm 程度)全身動態イメージング

ー＜主要開発3方法＞

これらの中で体内動態イメージングレベルの最初に位置付けられ、最も主要な核をなすのが、体内拡散部位を明らかにする全身動態イメージングである。既に第1年度に開発着手していた

①収束X線プローブ元素マッピングーXSAM

(X線走査型分析顕微鏡)元素マッピング法

②レーザーアブレーション/マススペクトルマッピング(レーザーマスあるいは質量顕微鏡)法

の2方法に加え、本年度は

③MRI法

の適用も可能にし、実験を始めた。

①XSAM 元素マッピング法

X線走査型分析顕微鏡(XSAM: 図2)を用いて収束X線プローブを照射し、試料から発光した蛍光X線をマッピングし100ppmレベルの高感度元素分布像を得る(分解能100nm~10μm)。

検出元素はNa以上の元素であり、電子線によるSEM-EDS(エネルギー分散型X線元素分析)やEPMA(電子線プローブマイクロアナライザー)法に比べ、分解能は低く強度が低く時間は要するが、高感度であり100ppmレベルの検出がラットのような広領域で大気中分析が可能である。

本年度は昨年度に比べ、さらに適用を広げ(図5~10)、さらに化学分析との比較校正により(図11)、定量評価を可能にし、その高感度・定量性に対する妥当性・信頼性を実証することができた(後出 D3. 体内動態微粒子の定量評価参照)。

②レーザー/マス法

(質量顕微鏡法 / MALDI-TOF-MS 法)

水溶性フラレン(C60)を結合させた試料中ターゲット物質にレーザービームを照射すると蒸散後、容易にフラレン単体に乖離し、きわめて鋭いマススペクトルピークとして高感度に検出され、2次元分布像が得られる(分解能約50~100nm)。

XSAM 元素マッピング像では不可能なNa以下の軽元素を含む化合物、とりわけCNTや窒化ホウ素(BN)、PCB等、生体組織と同じC、N、Oの元素からなり元素マッピングでは区別が付かない物質には有効性が高い。

昨年度は水溶化フラレンの開発、抽出後、フラレン注入した臓器からのレーザー/マス・マッピングを行ったが、今年度は実際に投与したラットから採取した臓器からのフラレンの検出、臓器内分布、マススペクトルによる分子種同定、

経時変化のデータの取得を可能にした(図12, 13)。

③MRI法

MRI法ではナノ微粒子の体内動態を生きのまま3次的に可視化し、同一個体で経時変化を追跡することが可能である。MRIの適用には磁性ラベリングが必要であるが、今回は癌のハイパーサーミア治療(高周波誘導温熱療法)用に開発された酸化鉄(マグネタイト Fe₃O₄)ナノ微粒子を対象として行った(図14)。さらに投与前後の差異をより明瞭に示すために、画像処理を試みた。

D2. 体内動態挙動

①微粒子全身拡散経路

尾静脈注入による血流への直接投与の場合には、心臓に戻った後、XSAMマッピング法の結果ではTiO₂の場合(図8a)、投与直後まず肺に到達し、数時間から数週間かけて肝臓、さらに脾臓の順に拡散する。これは経口投与試験でも濃度は低い、経時的に同様な臓器間移行を示した。こうした経路を経て経時変化が起きるタイプに対して、Ptでは当初から脾臓に優先的にトラップされ、その後も引続き他の臓器に比べ滞留している比率が高い(図8b)。

②全身動態の微粒子サイズ依存性

TiO₂の場合、肺→肝臓→脾臓の臓器間移行が粒子径が小さいほど早く推移する傾向がある(図9)。

③微粒子材質による体内動態挙動の違い

TiO₂では投与直後、肺に到達し、数時間から数週間かけて肝臓、さらに脾臓へ移行した。Fe₃O₄、Fe₂O₃も挙動がこのタイプに近い。マグネタイト Fe₃O₄ではMRIにより肝臓、腎臓、脾臓から検出され、XSAMマッピングの結果と一致した。

Pt, W, Feでは投与直後から優先的に脾臓に到達・滞留している。

フラレン(C60)はレーザー/マス法で肝臓、腎臓で検出された。CNTは光顕とTEM観察から肺、肝臓、腎臓で検出された。ポリ乳酸は蛍光顕微鏡法で肺、脾臓に高濃度に検出された。

微粒子によってTiO₂等とPt, Fe, W等とでは、特に血流に乗って最初に到達する微細毛細血管からなる臓器である肺での捕捉/通過率が異なるように思われる。

④臓器にトラップされた微粒子の状態/凝集性

CNTは電顕観察で肺、肝臓に検出された状態は凝集体である。

ポリ乳酸では蛍光(クマリン)ラベリング後蛍光顕微鏡像(図15)のように、肺、脾臓、肝臓で臓器内に蛍光スポット像が観察されている。大きさから見て各スポットは1個のポリ乳酸微粒子に近い。粒子同士であまり凝集することなく、拡散、捕捉されているように思われる。

⑤フラーレンの体内動態—血液脳関門通過の可否について

フラーレンはCNTと同様、凝集性が高く、そのままでは体内拡散挙動の観察や個別のナノ微粒子に分散して抗癌剤を癌患部に選択的に血流下で移送するDDSとして応用することは難しい。水溶化処理し分散性を図ったフラーレンはレーザー/マス法の癌患部や特定臓器と特異的に結合する標識分子、抗癌剤、蛋白分子等の特定分子を高感度に検出するイメージング媒体として開発したものであるが、今年度は水溶化フラーレンそのものの体内動態をレーザー/マス法で可視化した。質量M=C60=720付近マススペクトルピークで可視化したのが図12である。ラットに投与1時間後の臓器マッピング像では腎臓にわずかに、肝臓により多く存在が認められ、脳、肺では検出されなかった。また投与24時間後にはいずれの臓器からもフラーレンは検出されなかった。今回の結果はまだ予備実験的な結果であるが、フラーレンはすみやかに体外に排出された可能性がある。

また脳からは今回の結果ではフラーレンは検出されなかった。脳に関してはフラーレンが脳内組織に侵入するか否かについて議論がある。脳には血液脳関門があり、大部分のイオンや分子量の大きい化合物が血液から脳組織へ移行するのを防御するとされる。フラーレンを投与した魚類で脳に有意差があったとする報告が出され脳関門を通過したとして反響を呼んだが、その実験はフラーレンの直接的検出実験ではなかった。今回得られた結果で血液脳関門を通過して脳に到達しているか否かについて結論するのは時期尚早であるが、今後直接検証できる可能性は十分にあるといえよう。

D3. 体内動態微粒子の定量評価

①臓器内濃度

マウスに投与1日後のPt粒子の体内分布について、図10は各臓器のPt濃度を示すXSAM

元素マッピング像で、図11はこれに対応する化学分析(ICP-AES)の結果で、各臓器に含まれるPt濃度(a)、およびPt総量(b)を示している。

XSAMマッピング像では脾臓で最も高濃度に検出され、肝臓がこれに次ぐ(図10b)。ICP分析では図11aを濃度単位にすると、脾臓で約2000ppm(0.2%)、肝臓で700ppm(0.07%)、腎臓は<50ppmとなり、脾臓にPtは最も高濃度に存在しXSAMの結果と一致している。

②XSAMマッピングの定量性—化学分析(ICP-AES)による比較校正

図11aの化学分析の値が正しく対応すると仮定すれば、図10bの脾臓のコントラストは約2000ppm(0.2%)、肝臓は700ppm(0.07%)の濃度を反映しているということになる。XSAMの感度はこの場合、約100ppm(0.01%)のレベルといてよく、過去に様々な分析を行って得られていた結果と一致する。本研究で使用しているXSAM(X線走査型分析顕微鏡/堀場製作所製)の型式は最初のモデルであり、入射X線をプローブに集光するX線ガイドチューブ(XGT)は十分な強度を得る必要性から開口径が100 μ mのものを使用し、したがって空間分解能も100 μ mであるが、X線集光率を高めた改良型では分解能10 μ mで同等の感度が得られるだろう。

③臓器内総量

一方、臓器内に含まれるPt総量はICP分析(図11b)によれば、肝臓で最も多い。XSAMマッピングで言えば、これは図10bにおける各臓器について臓器の大きさも考慮に入れた

$$\text{臓器内総量} = \text{コントラストの明るさ(=濃度)} \\ \times \text{臓器面積(体積を反映)}$$

に対応するものと理解される。

化学分析との比較から、図10のXSAMマッピングのコントラストは濃度を、各臓器の面積分強度が臓器内総量を反映しており、脾臓で最も高濃度で、臓器の体積を考慮に入れれば、総含有量は肝臓で最も多いと理解される。

④体内残存率

微粒子の投与後体内残存率を評価すると、初期投与全量は6mgであり、

$$\text{臓器内捕捉率} = \text{臓器内総量} / \text{投与全量} \\ \text{体内残存率} = \text{各臓器内総量(含有量)} / \text{投与全量}$$

とすれば、図11bの各臓器の含有量から、投与

1日後の時点で投与全量のうち約25%が肝臓に、5%が脾臓にトラップされていることになる。その他の臓器も含めれば、初期投与量の40%近くが臓器で検出されたことになり、血流に乗った微粒子の相当程度が臓器に捕捉されていること、低濃度であるにもかかわらず、XSAMマッピング法が半定量的に信頼性高く濃度を検出・反映していること、本研究方法の妥当性・信頼性を実証するものと考えられる。

D4. ナノサイジング誘起生物学的プロセスによる機能性転換

D4.1 ナノサイジングによるアパタイトの骨置換性転換

骨組織を模倣したバイオミメティック・ナノアパタイト-コラーゲン/コンポジットを骨欠損部に埋入すると(図21)、ナノコンポジット部(黒*)が吸収されるとともに、これに隣接して骨細胞を含む新生骨(白*)が不可分に形成される。ここでは破骨細胞と骨芽細胞が協同的に作用して、コンポジットの吸収と新生骨形成が互いに隣接して進行し、結果として骨置換性が達成されている。

ナノサイジングにより、一見図18の場合の、インプラント周囲の骨吸収による失敗例のときと同様な炎症が誘発されているように見えるが、図21では骨欠損部またはそれに類似した周囲状況の違いより、破骨細胞と骨芽細胞を分化・誘導し、それらの協同的活動を導くに至るといった生物学的プロセスを通して、マクロにおける非骨置換性からナノにおける骨置換性へと機能性転換が起きている。

D4.2 ナノサイジングとリモデリング

天然骨においては破骨細胞と骨芽細胞の活動により、骨吸収と形成のプロセスを不断に繰り返すリモデリングが常時進行しているが、それを可能にしているのは骨を構成するナノアパタイトという材料のナノサイジング効果である。言い換えれば、骨のアパタイトがナノ結晶でなければリモデリングは起こり得ず、骨組織・細胞の新生や成長は起こり得なかったであろう。ナノサイジング効果は生体の生命活動、反応機構、維持活動に密接に関連した本質的な効果であると言える。

D4.3 生物学的プロセスによる機能性転換

人工関節で発生するポリエチレン、Ti、生体親和性ガラス等の摩耗粉が炎症を誘発し、やがて骨融解(Osteolysis)に至る現象には、マクロで現

れる生体親和性が生物学的プロセスを通してミクロ/ナノで為害性に作用する、やはりある種の機能性転換を結果として生じている。

ミクロ/ナノサイジングに伴う比表面積増大効果は化学反応性の増進をもたらす化学的效果で、ミクロ/ナノサイズ化の際に最も普通に考えられる効果であるが、これは材料自体に基づく効果で、生体とは関係無く発現する。そこでは反応性や刺激・為害性など同一機能性が著しく昂進するのが特徴である。

これに対し、物理的微粒子サイズ効果では炎症という生体本来の反応を誘導して、サイトカイン放出、これに引続く貪食細胞や骨芽細胞等、その状況に必要な細胞の分化・誘導という生物学的プロセスを経て、マクロにおける生体親和性からナノにおける為害性(炎症性という生体防御反応)、あるいは非骨置換性から骨置換性という機能性転換を発現するに至る。このナノサイジング誘起生体反応効果は物質と生体との相互作用の根源に関する効果であり、ナノテクのバイオ応用を図る上で最も基本的な情報である。

D5 本研究の学術的・社会的意義

材料の微細化に伴う生体反応挙動は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。

また物質と生体との相互作用の根源を調べる本研究からは必然的に、ナノマテリアルではマクロとは異なり高機能性と刺激性の両面を併せ持つこと、ナノテクの人体への応用には、あらかじめナノ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という結論に至る。

ナノマテリアルの無秩序な放出に対しては、アスベストの二の轍を踏むなというナノテクのリスクアセスメントとしての産業労働衛生や地球環境保全の側からの要請がある。

本研究は国民の安心できるナノテク開発の確立に必要な基礎的データを整備する研究としても位置づけられ、またその応用を通して、全身健康・予防増進、高齢者の自立・QOLの実現、若年者層に負担の大きい扶養・介護、保険・福祉財政の低減に寄与するものである。

E. 結論