

1. 微粒子体内動態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、種々の可視化手法を開発/適用した。
2. 代謝に関与する臓器の特定に直結する全身動態の可視化には、①収束X線プローブ(XSAM)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・マッピング法、③MRI法を開発/適用した。
3. 化学分析(ICP-AES)法との比較校正により、XSAM 元素マッピング法の定量性と各臓器中の微粒子濃度、含有量、初期投与量に対する体内残存率等の定量解析を可能にし、開発した可視化手法の妥当性・信頼性が実証された
4. 体内拡散の経路、体内動態の微粒子材質依存性、粒度依存性を調べた。
5. 物理的微粒子サイズ効果が誘起する生物学的プロセスを通して、ナノサイジングはマクロの生体親和性から為害性へ、非骨置換性から骨置換性へと機能性転換を導くこと、骨のリモデリングなど生命現象に本質的であることを示した。
6. 人工関節・インプラントから発生する摩耗粉等に起因する骨融解ほかの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カフォールドの開発、その他の可視化法の開発を行った。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) F.Watari, S.Abe, C.Koyama, A.Yokoyama, T.Akasaka, M.Uo, M.Matsuoka, Y.Totsuka, M.Esaki, M.Morita, T.Yonezawa: Behavior of In Vitro, In Vivo and Internal Motion of Micro/Nano Particles of Titanium, Titanium Oxides and Others, J.Cera.Soc.Jap., 116 (1), 1-5, 2008
- 2) F. Watari, K.Tamura, A.Yokoyama, K.Shibata, T.Akasaka, B.Fugetsu, K.Asaoka, M.Uo, Y.Totsuka, K.Tohji: Biochemical and Pathological Responses of Cells and Tissue to Micro- and Nanoparticles from Titanium and other Materials, Handbook of Biomineralization, Ed. M.Epple and E.Bauerlein, WELEY-VCH, Weinheim, 127-144, 2007
- 3) F.Watari, A.Yokoyama, M.Gelinsky, W.Pompe: Conversion of Functions by nanosizing from osteoconductivity to bone substitutional properties in apatite, Interface Oral Health Science 2007, Ed. M.Watanabe and O.Okuno, Springer, Japan, 139-147, 2007
- 4) M.Gelinsky, A.Bernhardt, M.Eckert, T.Hanke, U.Konig, A.Lode, A.Reinstorf, C.Vater, A.Walther, A.Yokoyama, F.Watari: Biomaterials based on mineralised collagen an artificial extracellular bone matrix, Interface Oral Health Science 2007, Ed. M.Watanabe and O.Okuno, Springer, Japan, 323-328, 2007
- 5) F.Watari, S.Abe, K.Tamura, M.Uo, A.Yokoyama, Y.Totsuka: Internal Diffusion of Micro/Nanoparticles Inside Body, Bioceramics Vol.20 Part 1,(Key Engineering Materials Vols.361-363), Trans.Tech.Publ., 95-98, 2008
- 6) F.Watari, S.Abe, C.Koyama, A.Yokoyama, T.Akasaka, M.Uo, M.Matsuoka, Y.Totsuka, M.Esaki, M.Morita, T.Yonezawa: Internal Motion of Micro/Nano Particles of Titanium Oxides and Others in the Body, Proc.Asian BioCeramics Sym. 2007, 13-18, 2007
- 7) 亘理文夫: CNTの生体影響(in-vitro)", ナノカーボンハンドブック、エヌ・ティー・エス, 887-893, 2007
- 8) 亘理文夫: 各ナノ粒子・微粒子の毒性評価・安全性試験の動向、第1節 各化学物質 [5] 金属 ナノ粒子", ナノ粒子の有害性評価とリスク対策、技術情報協会, 436-449, 2007
- 9) F.Watari N.Abe, K.Tamura, A.Yokoyama, T.Akasaka, M.Uo: Biological reaction to micro/nano particles of titanium and oxides, Proc.6th Int.Symp.Titanium in Dentistry, 68-69, 2007
- 10) M.Uo, K.Asakura, A.Yokoyama, F.Watari: Chemical state analysis of titanium in the surrounding tissues of dental, Proc.6th Int.Symp.Titanium in Dentistry, 159, 2007
- 11) Y. Zhu, F.Watari : Surface Carbonization of Titanium for Abrasion-resistant Implant Materials, Dent.Mat.J.26(2), 245-253, 2007
- 12) M.Uo, K.Asakura, A.Yokoyama, M.Ishikawa, K.Tamura, Y.Totsuka, T.Akasaka, F.Watari:X-ray Absorption Fine Structure(XAFS) Analysis of Titanium-implanted Soft Tissue, Dent.Mat.J.26(2), 268-273, 2007
- 13) N.Aoki, T.Akasaka, F.Watari, A.Yokoyama : Carbon Nanotubes as Scaffolds for Cell and Effect on Cellular Functions, Dent.Mat.J.26(2), 178-185, 2007
- 14) S.Liao, F.Watari, G.Xu, M.Ngiam, S.Ramakrishna, C.K.Chan :Morphological effects of variant carbonates in biomimetic hydroxyapatite, Materials Letters 61, 3624-3628, 2007
- 15) S.Liao, M.Ngiam, F.Watari, S.Ramakrishna, C.K.Chan :Systematic fabrication of nano-carbonated hydroxyapatite collagen composites for biomimetic bone grafts, Bioinspiration & Biomimetics 2, 37-41, 2007
- 16) S.Liao, F.Watari, Y.Zhu, M.Uo, T.Akasaka, W.Wang, G.Xu, F.Cui :The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen / PLGA composite membrane in vitro, Dental Materials 23,

1120-1128, 2007

- 17) S.Liao, G.Xu, W.Wang, F.Watari, F.Cui, S.Ramakrishna, C.K.Chan : Self-assembly of nano-hydroxyapatite on multi-walled carbon nanotubes, *Acta Biomaterialia* 3, 669-675, 2007

## 2. 学会発表

- 1) 寺田典子, 宇尾基弘, 久保木芳徳, 北川善政, 亘理文夫 : 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, *歯科材料・器械* 26(2), 111, 2007  
第 49 回日本歯科理工学会学術講演会, H19/5/12-13, 札幌 (札幌コンベンションセンター)
- 2) 宇尾基弘, 阿部薫明, 赤坂司, 亘理文夫 : カーボンナノチューブ膜の作製と物性, *歯科材料・器械* 26(2), 195, 2007  
第 49 回日本歯科理工学会学術講演会, H19/5/12-13, 札幌 (札幌コンベンションセンター)
- 3) 阿部薫明, 赤坂司, 宇尾基弘, 久保木芳徳, 亘理文夫 : 各種金属微粒子の体内動態のイメージング, *歯科材料・器械* 26(2), 241, 2007  
第 49 回日本歯科理工学会学術講演会, H19/5/12-13, 札幌 (札幌コンベンションセンター)
- 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* の増殖阻害機構, *歯科材料・器械* 26(2), 245, 2007  
第 49 回日本歯科理工学会学術講演会, H19/5/12-13, 札幌 (札幌コンベンションセンター)
- 5) 亘理文夫, 阿部薫明, 坂口紀史, 権山敦郎, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘 : X S A Mによる微粒子の全身動態観察, 日本顕微鏡学会第 63 回学術講演会発表要旨集後期登録セッションポスター発表演題, 7, 2007  
日本顕微鏡学会第 63 回学術講演会, H19/5/20-22, 新潟 (朱鷺メッセ)
- 6) F.Watari, S.Abe, T.Akasaka, M.Uo, M.Matsuoka, N.Takashi, Y.Totsuka: Reaction of cell and tissue to material nanosizing, *Abst. 17th Iketani Conference The DOYAMA Symposium on Advanced Materials*, p.4, 2007  
17th Iketani Conference The DOYAMA Symposium on Advanced Materials, 9/5-8/2007, Tokyo(Yayoi Auditorium Ichijo Hall The University of Tokyo)
- 7) F.Watari, S.Abe, C.Koyama, A.Yokoyama, T.Akasaka, M.Uo, M.Matsuoka, Y.Totsuka, M.Esaki, M.Morita, T.Yonezawa: Internal Motion of Micro/Nano Particles of Titanium Oxides and Others in the Body, *Proc.Asian BioCeramics Symposium 2007*, 13-18, 2007  
*Archives of BioCeramics Research Vol.7*, 9/25-27/2007, Osaka(Media Center, Osaka City University)
- 8) 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のアパタイト修飾, 第 17 回無機リン化学討論会講演要旨集, 104-105, 2007  
第 17 回無機リン化学討論会, H19/10/2-3, 札幌市 (JST イノベーションプラザ北海道)
- 9) 宇尾基弘, 赤坂司, 阿部薫明, 亘理文夫 : Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 系水溶性ガラスの作製と細胞毒性評価, 第 17 回無機リン化学討論会講演要旨集, 50-51, 2007  
第 17 回無機リン化学討論会, H19/10/2-3, 札幌市 (JST イノベーションプラザ北海道)
- 10) F.Watari, S.Abe, K.Tamura, M.Uo, A.Yokoyama, Y.Totsuka: Internal Diffusion of Micro/Nanoparticles Inside Body, *Proc.of 20th Int.Symp.Cera.Med.(ISCM)*, *Bioceramics Vol.20 Part1,(Key Engineering Materials Vols.361-363),Trans.Tech.Publ.*, 94-95, 2007  
20th Int.Symp.Cera.Med., 10/24-26/2007, Nantes(France, International Convention Center)
- 11) F.Watari, S.Abe, C.Koyama, S.Inoue, T.Akasaka, M.Uo, M.Matsuoka, N.Takashi, Y.Totsuka, E.Hirata, A.Yokoyama, M.Esaki, M.Morita, T.Yonezawa: Effect of nanosizing of materials on living organism, *Proc. Int.Symp.Nano Sci.Tech.(ISNST) 2007*, 43-52, 2007  
Int.Symp.Nano Sci.Tech. (ISNST) 2007, 11/8-9/2007, Tainan (Southern Taiwan University of Technology)
- 12) F.Watari, S.Abe, C.Koyama, S.Inoue, T.Akasaka, M.Uo, M.Matsuoka, N.Takashi, Y.Totsuka, E.Hirata, A.Yokoyama, M.Esaki, M.Morita, T.Yonezawa: High Resolution Observation of Carbon Nanotubes Implanted in Tissue by High Voltage Electron Microscopy, *Proc. Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007*, 156, 2007  
Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007, 11/21-24/2007, Bangkok(The Inperial Queen's Hotel)
- 13) T.Akasaka, S.Abe, M.Uo, F.Watari: Inhibition of Growth of *Streptococcus Mutans* by Artificial Glyco-polymer, *Proc. Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007*, 155, 2007  
Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007, 11/21-24/2007, Bangkok(The Inperial Queen's Hotel)
- 14) M.Uo, T.Akasaka, S.Abe, F.Watari: XAFS Analysis of Ti, Ni-Ti and SUS304 Implanted Rat SoftTissues, *Proc. Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007*, 157, 2007  
I Int.Dent.Mat.Cong. (IDMC) 2007, 11/21-24/2007, Bangkok (The Inperial Queen's Hotel)
- 15) M.Esaki, S.Abe, I.Kido, T.Akasaka, M.Uo, F.Watari: Determination of Administered Magnetite Nanoparticles in Mice:Magnetic Resonance Imagung and X-ray Scanning Electronics Microscope, *Proc. Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007*, 173, 2007  
Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007, 11/21-24/2007, Bangkok(The Inperial Queen's Hotel)
- 16) S.Abe, C.koyama, T.Akasaka, M.Uo, Y.Kuboki, F.Watari: Visualization of Distribution of Inorganic Micro/Nano Particles in Mice Using X-ray Scanning Electronic Microscope, *Proc. Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007*, 174, 2007  
Int.Dent.Mat.Cong. (IDMC) 2007, 11/21-24/2007, Bangkok (The Inperial Queen's Hotel)
- 17) M.Terada, M.Uo, Y.Kitagawa, F.Watari: Development of Multi Walled Carbon Nanotubes Coated Collegen for Cell Culturing, *Proc. Int.Dent.Mat.Cong.(IDMC) 2007*, 178, 2007

- Int.Dent.Mat.Cong. (IDMC) 2007, 11/21-24/2007, Bangkok (The Imperial Queen's Hotel)
- 18)石川紘佑、赤坂司、八若保孝、鈴木正哉、亘理文夫：Imogolite 上での細胞培養、平成 19 年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会「顕微鏡・イメージングとその応用の多様な展開」講演要旨集, 7, 2007  
平成 19 年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会「顕微鏡・イメージングとその応用の多様な展開」, H19/12/1, 札幌 (北海道大学歯学部講堂)
- 19)赤坂司、亘理文夫：カーボンナノチューブ上のアパタイト形成、第 20 回日本アパタイト研究会要旨集 (過去全プログラム集録), 60-63, 2007  
第 20 回日本アパタイト研究会, H19/12/17, 東京都 (東京都立産業技術研究センター)
- 20)亘理文夫、横山敦郎、戸塚靖則、北川善政、森田学、八若保孝、川浪雅光：材料のナノサイジングに基づく生体反応とその応用、日本歯科医学会誌 vol.27, 90, 2008  
歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い, H20/1/12, 東京 (新歯科医師会館)
- 21)亘理文夫：材料のナノサイジングに対する生体反応、材料の微細組織と機能性 第 133 委員会 第 196 回研究会資料, 19-34, 2008  
材料の微細組織と機能性 第 133 委員会, H20/1/25, 東京 (東京理科大学理窓会館)
- 22)阿部薫明、江崎光恵、森田学、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫、小山千佳、Iosif Danel Posca、久保木芳徳：マウス体内での有機・無機粒子の体内循環挙動の追跡、第 20 回代用臓器・再生医学研究会総会抄録集, p.1, 2008  
第 20 回代用臓器・再生医学研究会総会, H20/2/2, 札幌 (北海道大学学術交流会館)
- 23)赤坂司、横山敦郎、松岡真琴、阿部薫明、宇尾基弘、橋本剛、亘理文夫：単層カーボンナノチューブ透明導電性薄膜での骨芽細胞様細胞の培養、第 20 回代用臓器・再生医学研究会総会抄録集, p.1, 2008  
第 20 回代用臓器・再生医学研究会総会, H20/2/2, 札幌 (北海道大学学術交流会館)
- 24)Xiaoming Li, Qingling Feng, Fuzhai Cui, 宇尾基弘、赤坂司、亘理文夫：ヤギシャンク骨欠損モデルを用いたキチン質繊維強化 ナノアパタイト/コラーゲンコンポジットの骨修復特性評価、第 20 回代用臓器・再生医学研究会総会抄録集, 2, 2008  
第 20 回代用臓器・再生医学研究会総会, H20/2/2, 札幌 (北海道大学学術交流会館)
- 25)久保木芳徳、寺田典子、北川善政、宇尾基弘、亘理文夫：コラーゲン分子のトリプルヘリクス構造がカーボンナノチューブとの反応に必須である、第 20 回代用臓器・再生医学研究会総会抄録集, p.5, 2008  
第 20 回代用臓器・再生医学研究会総会, H20/2/2, 札幌 (北海道大学学術交流会館)
- 26)亘理文夫、朱禹赫、宇尾基弘：インプラントの耐摩耗性改善のための Ta,Ti の炭化・窒化、チタンと歯科臨床 第 6 巻第 1 号, 26, 2008  
第 21 回歯科チタン学会学術講演会, H20/2/15-16, 徳島 (ルネッサンスリゾートナルト)
- 27)亘理文夫 (オーガナイザー)：第 4 回「ナノトキシコロジーアクセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会抄録集  
H19/8/1, 東京 (タワーホール船堀)
- 28)亘理文夫 (オーガナイザー)：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」(課題番号：H18-化学-一般-006)平成 19 年度・秋期第 3 回研究成果発表会抄録集  
H19/11/12-13, 登別 (第一滝本館)
- 29)亘理文夫 (オーガナイザー)：平成 19 年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会「顕微鏡・イメージングとその応用の多様な展開」講演要旨集  
H19/12/1, 札幌 (北海道大学歯学部講堂)
- 30)亘理文夫 (オーガナイザー)：第 5 回「ナノトキシコロジーアクセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会抄録集  
H19/12/18, 名古屋 (財団法人ファインセラミックスセンター)
- 31)亘理文夫 (オーガナイザー)：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」(課題番号：H18-化学-一般-006)平成 19 年度・冬期第 4 回研究成果発表会抄録集  
H20/2/25-26, 苫小牧 (ホテルニドム)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
いずれもなし

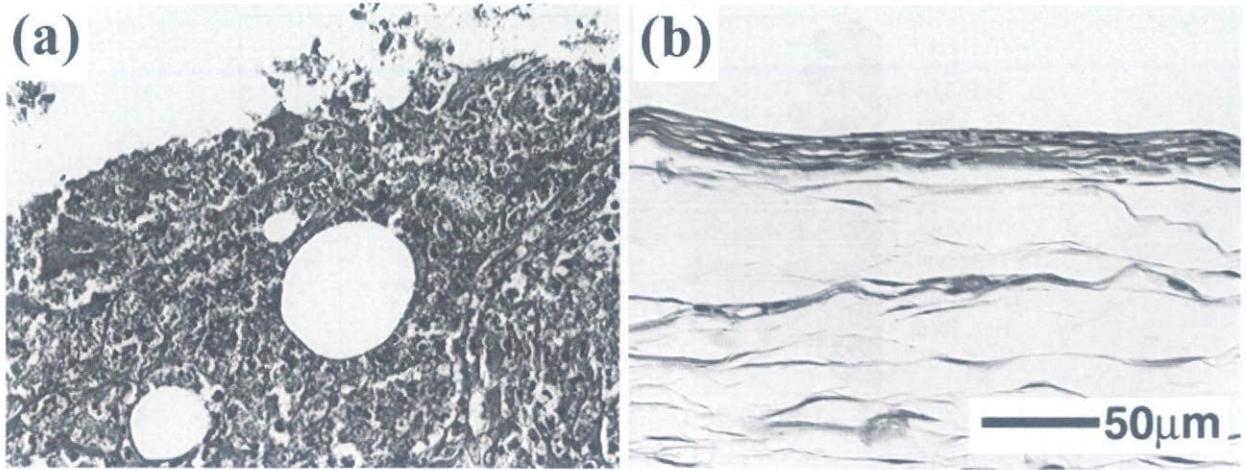


図1 マクロサイズの金属に対する軟組織の反応(ラット皮下埋入1週後)。 a : Ni, b : Ti

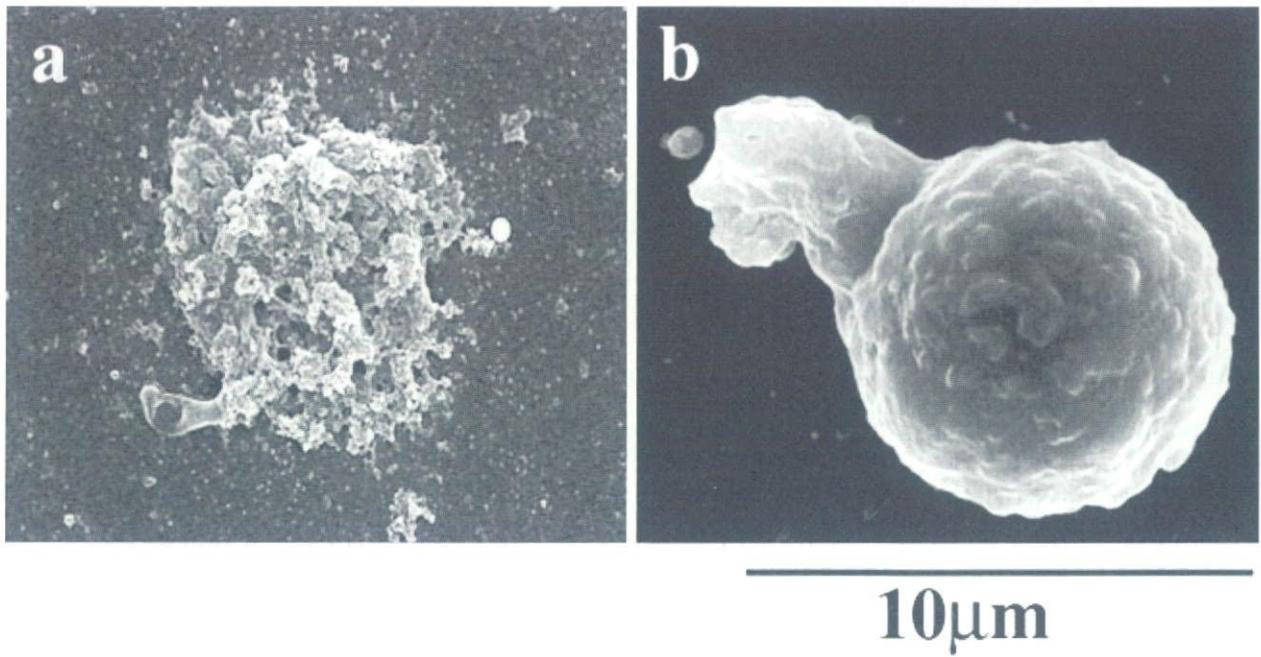


図2 微粒子に対するヒト好中球の反応(SEM 像)。 a : Ni (0.5 $\mu$ m)、 b : Ti (0.5 $\mu$ m)

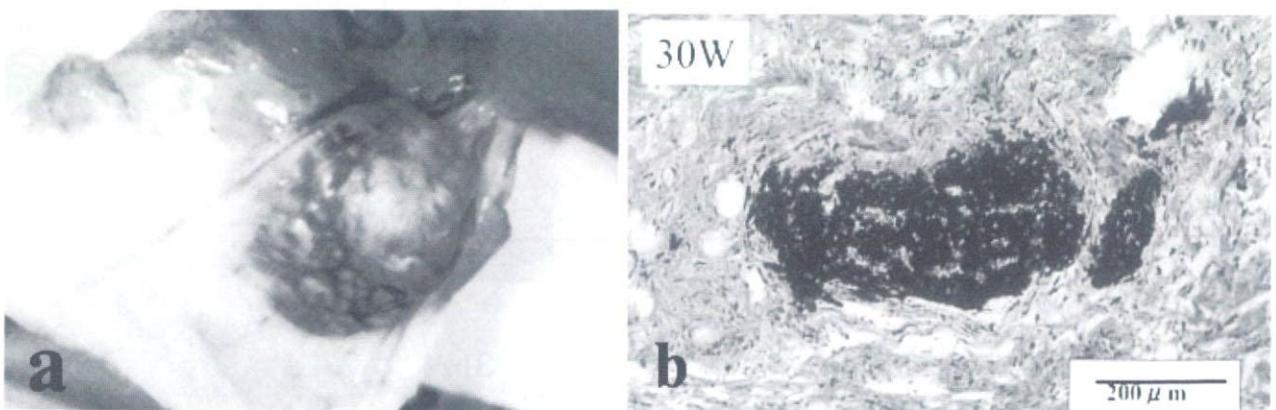


図3 ラット軟組織に長期(6ヵ月~1年)埋入後の金属微粒子に対する反応。 a : Ni (0.5 $\mu$ m)、 b : Ti (0.5 $\mu$ m)

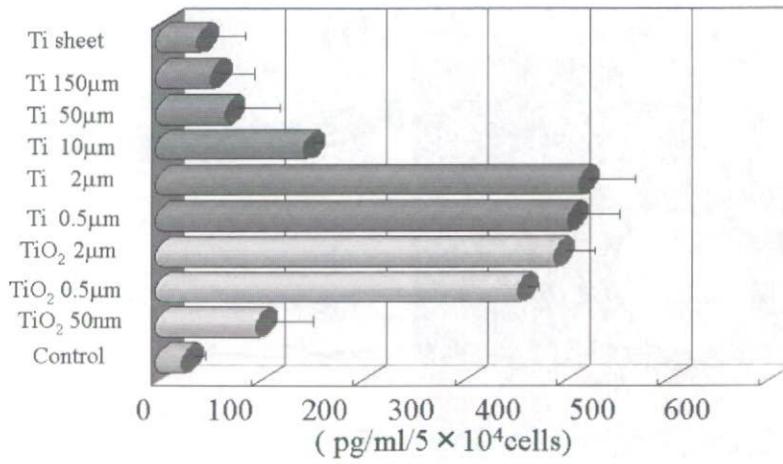


図4 TNF- $\alpha$  産生のナノサイズ領域を含む微粒子サイズ依存性

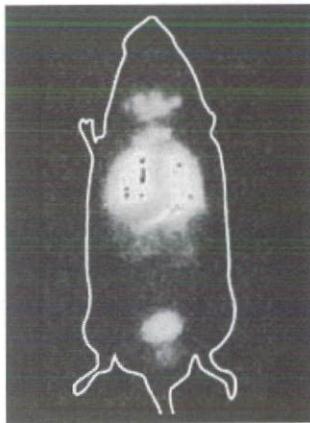


図5 呼吸器系からのナノ微粒子の体内侵入/全身拡散：30nmTiO<sub>2</sub> 粒子の強制露曝試験後のXSAM マッピングによるラット体内の全身Ti 元素分布像。

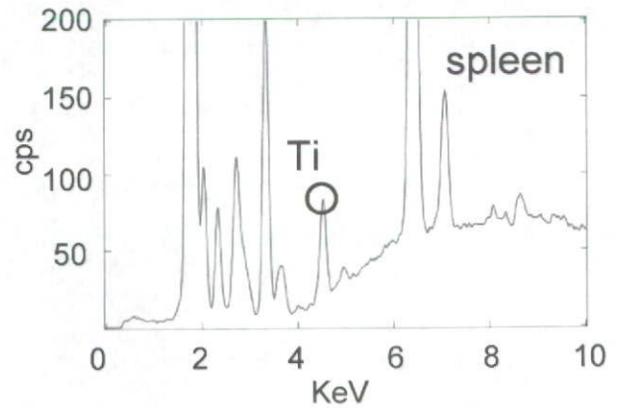


図6 消化器系からのナノ微粒子の体内取込/全身拡散：30nmTiO<sub>2</sub> 粒子を10日間投与後の脾臓からのX線元素分析。Tiが検出される。

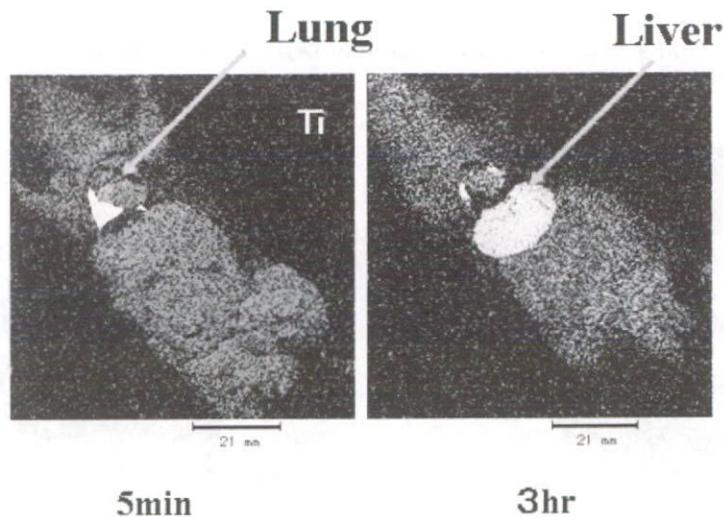


図7 ナノ微粒子の体内動態(尾静脈注入後、XSAM 元素マッピング)：30nmTiO<sub>2</sub> 粒子は肺から肝臓、脾臓へと移行する。

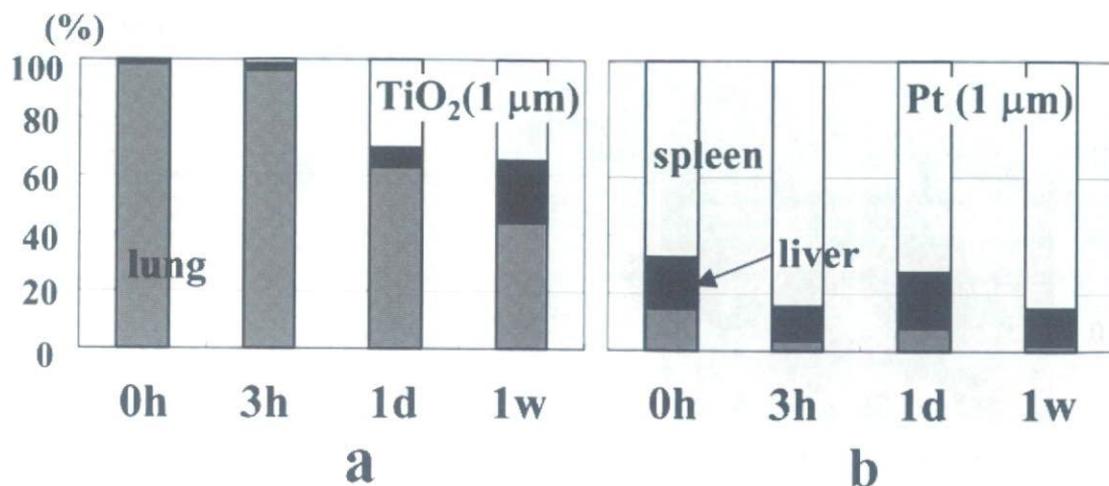


図8 微粒子の臓器間移行の経時的变化の材質依存性(Pt および  $\text{TiO}_2$ )。  $\text{TiO}_2$  では肺、肝臓、脾臓と移行するのに対し、Pt では投与直後から優先的に脾臓に到達・滞留する。

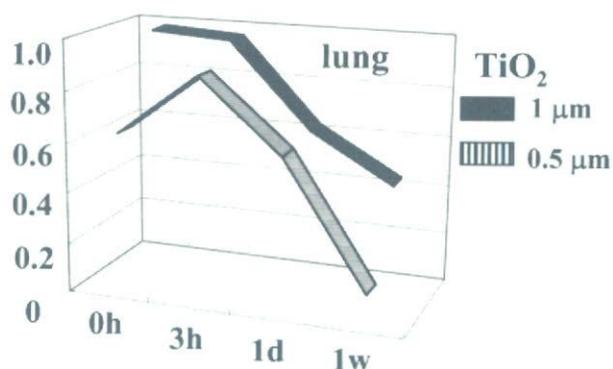


図9  $\text{TiO}_2$  粒子の臓器間移行の微粒子サイズ依存性。微細粒子では拡散が早く進展する。

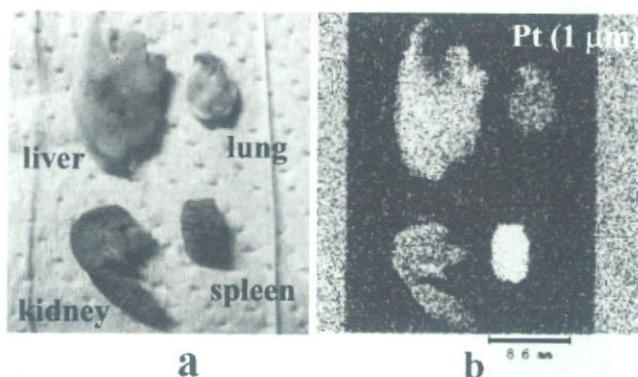


図10 Pt 粒子投与1日後のマウス各臓器(a)のPt 元素マッピング像(b)。脾臓で高濃度に検出され、肝臓がこれに次ぐ。

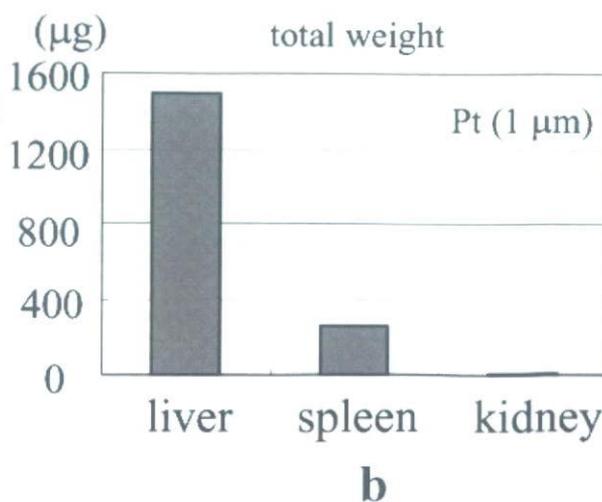
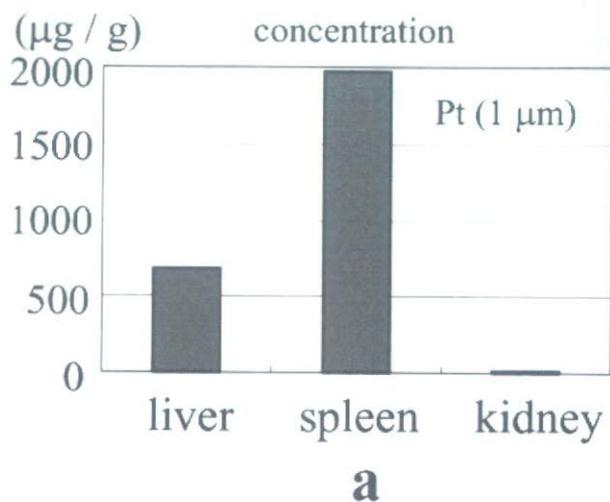


図11 化学分析(ICP-AES)による投与1日後、各臓器に含まれるPt濃度(a)、およびPt総量(b)。脾臓にPtは最も高濃度に存在するが、総量は肝臓で最も多い。

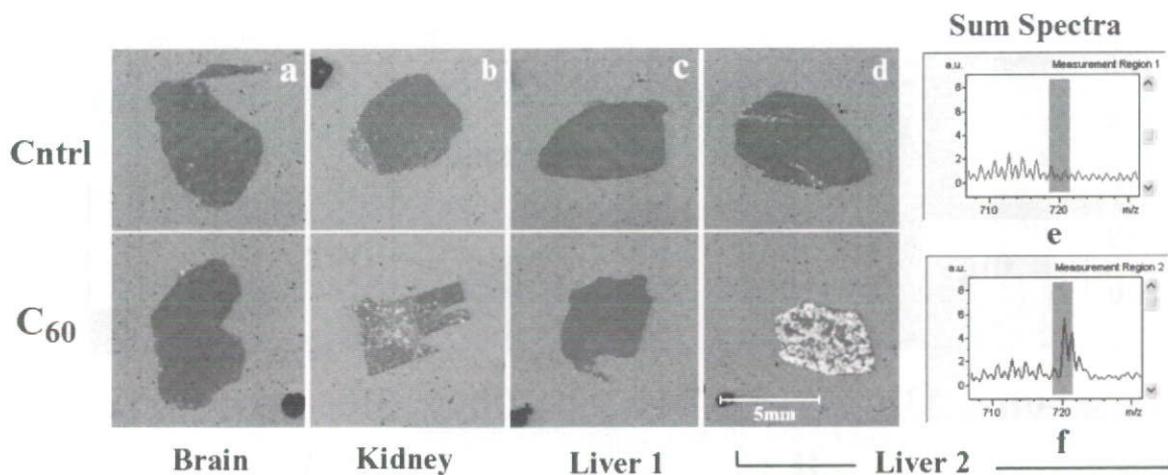


図12 水溶化フラーレン投与1時間後のラット各臓器中のC60のレーザーマス・マッピング。  
 a)脳、b)腎臓、c)肺、d)肝臓、e)肝臓全体のマススペクトル(投与前□d上に対応)、f)同(投与後□d下に対応)：C60 (M=720)付近にピークが認められる。

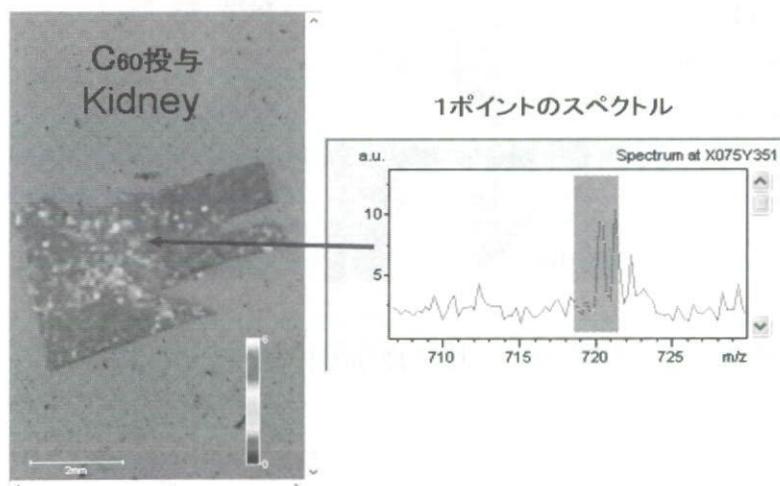
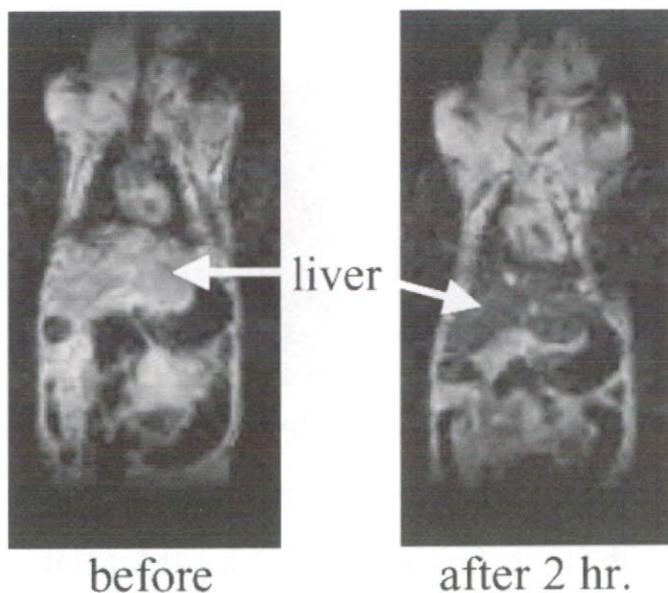


図13 水溶化フラーレン投与1時間後のラット腎臓のC60レーザーマス・マッピング(左)と腎臓内、1点からのマススペクトル(右)。C60 (M=720)付近にピークが認められる。

図14 マグネタイトナノ微粒子を尾静脈注入したマウスのMRI像。投与前(左)、投与2時間後(b)の比較から腎臓への濃縮が確認できる。



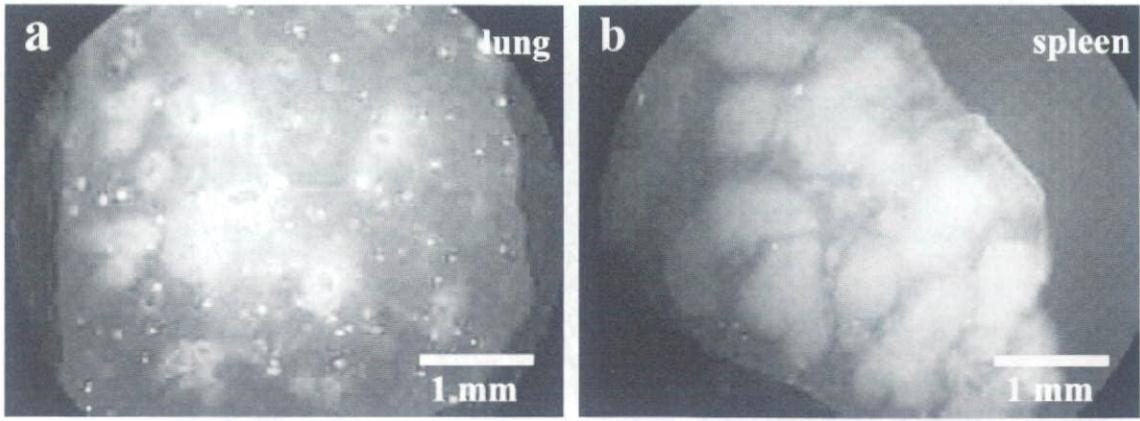


図 15 蛍光(クマリン)ラベリングしたポリ乳酸微粒子をマウス尾静脈へ注入1週間後の各臓器の蛍光顕微鏡像。

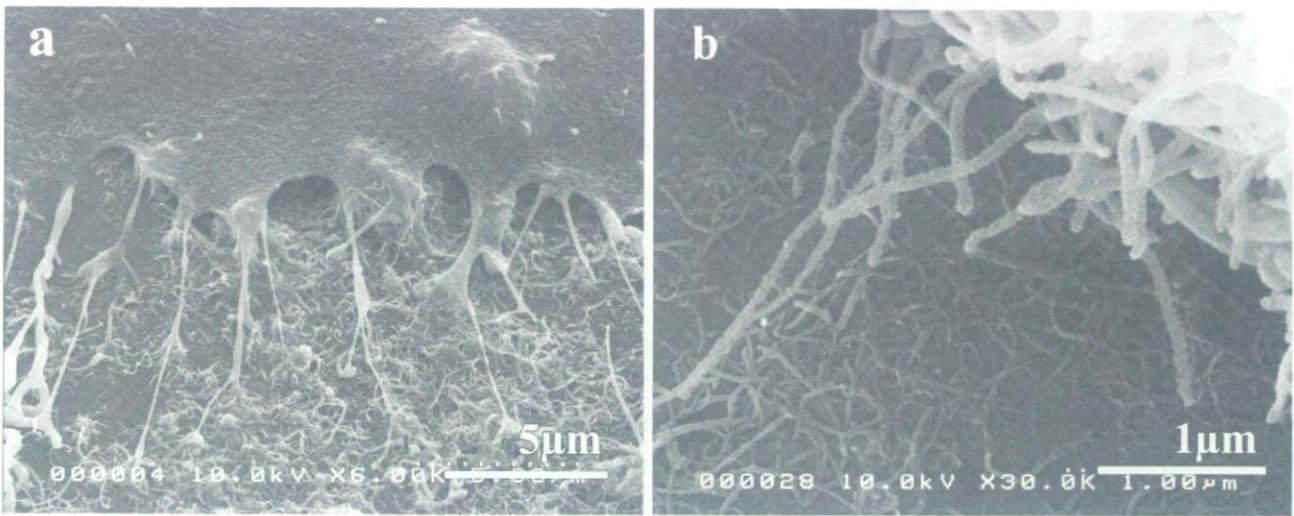


図 16 CNT スカフォールドと強く接着する細胞末端糸状仮足。(a)骨芽細胞様細胞 Saos2、(b)神経細胞 PC12



図 17 アパタイトコーティングチタン・デンタルインプラント

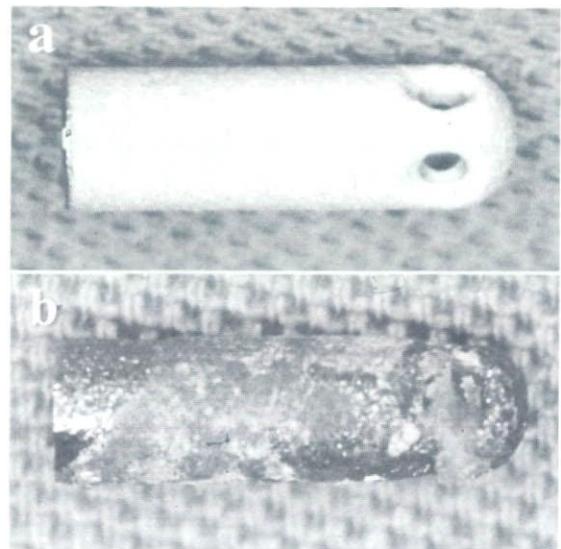


図 18 アパタイトコーティングチタン・デンタルインプラントの臨床適用失敗例

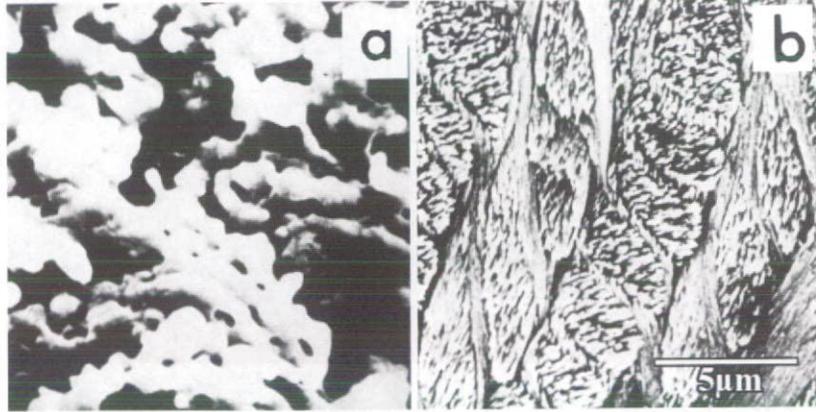


図19 アパタイトの2種の存在形態。a：合成アパタイト、b：天然骨(エナメル質)

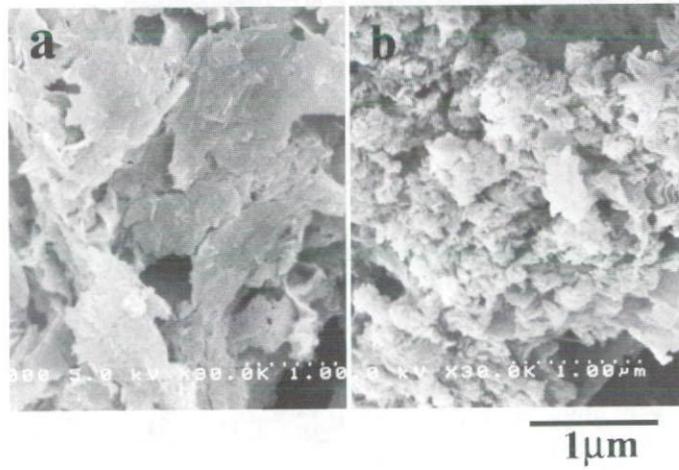


図20 合成アパタイトの粒子形態：コラーゲンなし(a)に比べ、コラーゲン共存下(b)では粒子サイズが著しく小さくなり 50nm 程度になる。

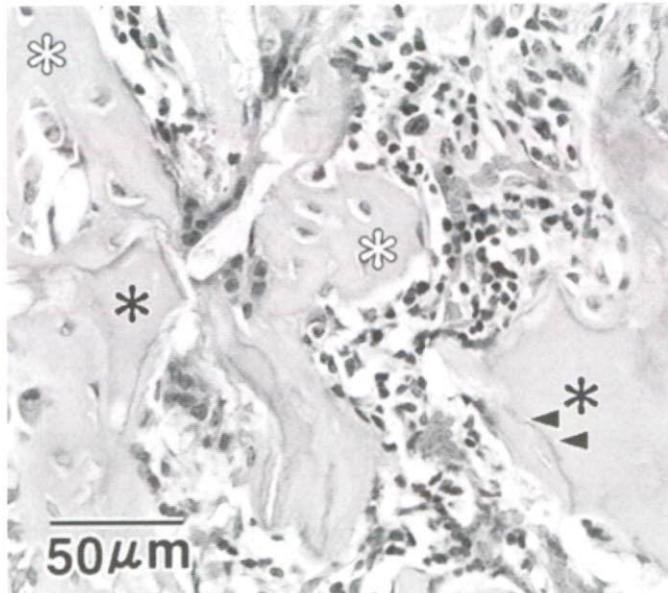


図21 ナノアパタイト-コラーゲンコンポジットの骨置換性。ナノコンポジット部(黒\*)の吸収と新生骨形成(白\*)が不可分に生じ、結果として骨置換性が達成されている。

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

生体に投与した有機・無機粒子の体内動態のイメージング

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	阿部薫明	北海道大学歯学研究科助教
分担研究者	森田 学	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	江崎光恵	北海道大学歯学研究科大学院生
研究協力者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科准教授
研究協力者	赤坂 司	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	久保木芳徳	北海道大学・名誉教授 (株)高研バイオサイエンス研究所

**研究要旨** 一般に生体親和性を持つと言われている材料でも、微小なサイズになるとその生体への影響が変化することが考えられる。数マイクロメートルからナノサイズの粒子が生体内に取り込まれた際、体内でどのように分布・循環し、特定臓器へと到達・滞留・排泄されているのかを追跡・可視化し、それら臓器に滞留した際の組織への影響（親和性・刺激性）の解明を目的とした。

研究2年目はマウスへの無機粒子の投与方法として、初年度から実施していた尾静脈注射による血流への直接投与の他、経口投与・肺への直接噴霧について検討し、後者2種類の投与方法においても、血中投与と同様に、体内の各臓器へと到達する様子が観測された。また、走査型蛍光エックス線分析顕微鏡・磁気共鳴画像撮像装置を用いる事により投与した無機粒子のマウス体内での分布・滞留の様子を経時的に可視化することに成功した。

今年度は有機物マイクロ粒子の体内動態の追跡にも着手し、血中投与したポリ乳酸、カーボンナノチューブ誘導体の体内分布の観察も行った。

#### A. 研究目的

マイクロ・ナノサイズの粒子が生体内に取り込まれた場合、一般に生体親和性を持つと言われている材料でも細胞に対して刺激性を持つことがある。我々はこれまでに、生体親和性に優れていると言われている生体材料でも、数ミクロンから数百ナノメートルのサイズになると細胞への刺激性を持つものがあることを見出した。一方で、人工関節やインプラントなどの長期使用により磨耗粉が生じ、体内に取り込まれる可能性は否定できない。また、医薬・化粧品

や日用品といった分野でもマイクロ・ナノ微粒子が広範囲に使用されてきている。それ故、我々は日常生活の中で知らないうちにマイクロ・ナノ粒子に曝されている可能性がある。

そこで本研究では、生体内に取り込まれたマイクロ・ナノサイズの有機・無機粒子の体内での循環・滞留・排泄の挙動、特定臓器への蓄積の有無などを確認することを目的とし、まず始めに光学的・分光学的手法を用いて、これら有機・無機粒子のマウス

体内での分布の追跡・その可視化を試みた。

## B. 研究方法

### 披験動物

オス 8-12 週齢の ICR 系マウスを用いた。

### 披験物質

投与無機粒子として、Ti (1-3  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ )、Fe (1-2  $\mu\text{m}$ , 2-3  $\mu\text{m}$ )、Ni (0.8, 3-7  $\mu\text{m}$ )、Pt (1  $\mu\text{m}$ )、TiO<sub>2</sub> (0.05  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ )、TiC (0.6-0.9  $\mu\text{m}$ )、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.5  $\mu\text{m}$ )、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (0.01  $\mu\text{m}$ )、W (1  $\mu\text{m}$ )、Mn (1-5  $\mu\text{m}$ )、ITO (10-20 nm) を用いた (括弧内は製造元データによる平均粒径)。ナノマグネタイト(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)は、東北大院環境・田路研より、ITO ナノ粒子は東大院理・米澤先生より提供していただいた。

また投与有機粒子として、蛍光色素(coumarin 6)をドープしたポリ乳酸(以下、m-PLA)、化学的に親水化処理した多層カーボンナノチューブ誘導体(以下、CNT-COOH)を作製した。m-PLA は Concordia 大・L Rosca 博士より提供していただき、北大院工・分子材料化学分野の協力でキャラクタリゼーションを行った。

### 投与と観測

無機粒子の a) けん濁液、b) 寒天中に分散させた試料、若しくは c) 乾燥粉末をマウスに投与し、一定期間観察した。投与方法としては、尾静脈からの血中投与(a)、経口投与(b)、及び肺への直接噴霧(c)を行った。その後、エーテルを用い、適宜安楽死させて肺・肝臓・脾臓などの臓器の一部を摘出した。各種無機粒子の臓器への到達・滞留の様子は摘出した臓器から 1 mm 厚の切片を作成し、堀場 XGT-2000 エックス線分析顕微鏡 (XSAM)、日立 P-4010 誘導結合プラズマ発光分析装置(ICP-AES、以下 ICP と略記)、および EDAX Genesis エネルギー分散型蛍光エックス線分析装置(SEM-EDS) により評価した。各摘出臓器を 800°C で灰化させ、王水に溶解させた溶液を用い、ICP 分析を行った。

また無機粒子の体内動態可視化のため、7 テスラの Varian 動物用磁気共鳴画像(MRI)撮像装置 INOVA による撮像を試みた。開腹したマウスの全身に対して XSAM による観察も行った。

有機粒子に関しては、投与・経過観察の後に各臓器を摘出し、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡および日立 H-800 透過型電子顕微鏡を用いて体内での分布の様子を観察した。

### (倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、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。

## C. 研究結果

血中投与を行った各種無機粒子の体内分布の経時変化を XSAM により追跡した。ITO の場合、投与直後に肺・脾臓から Sn の蛍光 X 線が強く検出されていたが、時間経過とともにその強度は減少し、4 週間経過後には、ほぼ観測されなかった(図 1)。その他の無機粒子についての観察結果、および粒子径の違いによる体内分布の経時変化について図 3, 4 に示す。

Pt 投与後の体内分布の経時変化を ICP により追跡した(図 5)。投与直後は、比較的各臓器に分布しているが、投与後の時間経過とともに、その分布が脾臓・肝臓へと局在化していた。また体内から検出された総量は経時的に減少する傾向が示された。

投与粒子の全身での分布状態を知るために、TiO<sub>2</sub> を投与したマウスを樹脂に包埋し、約 5 mm 厚に切断する事で、矢状断の連続切片を得た(図 6)。今回の試料では、TiO<sub>2</sub> の肺と肝臓への滞留が観測され、これまでの摘出臓器を用いた追跡結果と良い一致を得た(図 7)。このような試料を分析する事により、今後より詳細な体内分布の知見が得られることが予想される。

10 or 50 mg / day の条件で TiO<sub>2</sub> 若しくは Pt 粒子を 10 日間経口投与したのち、各臓器を摘出し XSAM を用いて滞留状態を確認したところ、TiO<sub>2</sub> を 50 mg / day の条件で投与した個体において、投与物質の肺・肝臓・脾臓への到達が観測された(図 8)。この結果から経口投与によっても無機物質が体内を循環し各臓器へと到達する事が示された。

Pt 粒子を肺へ直接噴霧したマウスの各臓器への分布を ICP により観察した(図 8-5, 6)。投与直後と 1 週間後とで体内分布が大きく異なり、また乾燥粉末が肺から他の臓器へと循環した事が示された。

磁性体として知られるマグネタイトは、水分子な

どのプロトンの緩和速度を低下させることにより、その磁気的影響の及ぶ範囲でMR像の輝度の低下を誘起する。それ故に、マグネタイトはMR撮像において「負の造影剤」として知られており、表面処理などにより臓器特異性を付与された薬剤が開発され、臨床へと応用されている。今回は、寒天中に様々な濃度でマグネタイトを分散させた試料を用い、その造影効果を示した(図9)。

ナノマグネタイト粒子を投与したマウスのXSAM、MRI測定結果を図10に示す。XSAMの結果からは、マグネタイトが肺・肝臓・脾臓・腎臓に到達している事が示された。MRI測定では、投与直後から肝臓・腎臓・脾臓において輝度の低下が確認された。これは、上述の臓器へのマグネタイトの到達によるものと考えられ、XSAMの結果とも一致する(肺については測定原理上、MR信号はほぼ観測されない)。この輝度の低下は投与後、経時的に進行した(図11)。

m-PLAのキャラクタリゼーションの結果、およびSEM像を図12に示す。今回得られたm-PLAは、蛍光色素を約2 wt%含有する粒子系1  $\mu\text{m}$ 程度の粒子であった。このm-PLAを尾静脈より投与し、1日後および1週間後のマウスの肺・肝臓・腎臓・脾臓の蛍光顕微鏡写真を図13に示す。どちらの条件でも相対的に肺・脾臓へとm-PLAが密に存在している様が観測された。

作製したCNT-COOHの合成スキームを図14に示す。CNT表面にカルボン酸を化学修飾することにより、数百ppmレベルでも容易に水中に分散するCNT誘導体が得られた。このCNT-COOHを尾静脈より投与した直後、および一週間後のマウスの肺・肝臓の顕微鏡写真を図15、16に示す。また投与直後の肺のTEM像を図17に示す。TEM像に見られるチューブ状の物質がCNT-COOHであり、顕微鏡により観察された黒い点は投与したCNT-COOHの高次の凝集体と考えられる。

#### D. 考察

図4、5に示したようにマウスに投与した無機粒子は体内の各臓器を循環し、特定の臓器へと局在化する。しかし時間経過とともにそれらの臓器からも流出しており、最終的には糞・尿といった形で体外へと排泄されるものと考えられる。それ故、これら

無機粒子の生体への刺激性を検討する為には、これら循環・滞留のタイムスケールを解明し、その滞留時間内で炎症等が惹起されるのか(時間的閾値)、若しくは排泄されきらずに残留する粒子が微量でも生体への刺激性を示すのか(量的閾値)について調べていく必要があると考えられる。

今回示したように、マイクロ・ナノ粒子の体内での分布状態・循環の速度は粒子の素材(化学種)と粒子径という2つの要因により変化する。例えば、同じ1  $\mu\text{m}$ 程度のPtとTiO<sub>2</sub>とでは、分布状態が大きく異なる。また酸化物同士(TiO<sub>2</sub>とFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>;粒子径0.5  $\mu\text{m}$ )でも分布状態は異なる挙動を示す。一方で、TiO<sub>2</sub>同士でも粒子径が異なると、体内を循環する速度(各臓器に滞留する時間)に違いが出てくる。サイズ効果の例としては、マイクロ粒子では殆ど見られなかった腎臓への到達についても、ナノサイズ(粒子径、約10 nm)のマグネタイトの場合には、XSAM・MRI双方の測定から腎臓へと到達している事が示された。

経口投与・肺への直接噴霧、ともにまだ実験は不十分ではあるが、両投与方法ともにいくつかの臓器へと到達している事、またその分布が血中投与した場合と同様な挙動を示す事が見出された。特に、肺への噴霧の場合、投与直後と1週間後とで体内分布が大きく変化した。乾燥粉末状態で投与されたのちに、体内を循環するという事は非常に興味深く、粉塵・排ガス・エアロゾルなど環境由来の暴露とその後の影響についても検討する必要があるといえよう。

m-PLAの実験結果から、有機物粒子も各臓器間で滞留の様子が異なる事が示された。CNT-COOHの場合は、血流中で凝集が予想された物質が体内で循環し、いくつかの臓器に到達している事が示された。今後は、これら有機物の体内分布についても詳細に検討していくつもりである。

#### E. 結論

これまでの実験結果から、体内での分布の様子は、粒子の化学種とその粒子径との2つの因子により変化する事が示された。また消化器系・呼吸器系からの投与を行った際にも、その後の体内分布は血中投与時と類似の結果になることが示唆された。

有機物マイクロ粒子を投与した場合にも、それらが体内で循環している様子を確認する事に成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Watari F, Abe S, Koyama C, Yokoyama A, Akasaka T, Uo M, Matsuoka M, Totsuka Y, Esaki M, Morita M, and Yonezawa T: Behavior of in vitro, in vivo and internal motion of micro/nano particles of titanium, titanium oxides and others, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116(1)**, 1-5 (2008)

### 2. 学会発表

1) 阿部薫明、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、亘理文夫：各種金属微粒子の体内動態のイメージング：平成19年度春期第49回日本歯科理工学会学術講演会（札幌、2007年5月13日）、同講演予稿集、p. 241、2007

2) 阿部薫明、小山千佳、Iosif Danel Rosca、赤坂司、宇尾基弘、古月文志、久保木芳徳、亘理文夫：マウスに投与したマイクロ・ナノ微粒子の体内動態の可視化法の開発：第4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（東京、2007年8月1日）、同講演予稿集、p. 34、2007

3) 小山千佳：X線分析顕微鏡を用いた金属微粒子のマウスの体内動態の観察：第49回歯科基礎医学会学術大会（札幌、2007年8月30日）、同講演予稿集、p. 198、2007

4) Mitsue Esaki, Shigeaki Abe, Ikuhiro Kida, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, Fumio Watari : Determination of administered magnetite nanoparticles in mice: Magnetic resonance imaging and X-ray scanning electronic microscope. : International Dental Materials Congress 2007 (Bangkok, 2007年11月24日)、同講演予稿集、p. 356、2007

5) Shigeaki Abe, Chika Koyama, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, Fumio Watari : Visualization of distribution of inorganic micro/nano particles in mice using X-ray scanning electronic microscope : International Dental Materials Congress 2007 (Bangkok, 2007年11月24日)、同講演予稿集、p. 357、2007

6) 阿部薫明、小山千佳、Iosif Danel Rosca、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、亘理文夫：有機・無機微粒子の体内動態イメージング法の検討：第29回日本バイオマテリアル学会（吹田、2007年11月27日）、同講演予稿集、p. 409、2007

7) 阿部薫明、小山千佳、江崎光恵、赤坂司、宇尾基弘、森田学、久保木芳徳、亘理文夫：各種マイクロ・ナノ粒子の生体内での分布状態の追跡とその可視化：第5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（名古屋、2007年12月18日）、同講演予稿集、p. 28、2007

8) 阿部薫明、亘理文夫、田地川浩人：カーボンナノ材料と金属イオン(Mn<sup>2+</sup>)との相互作用に関する理論的研究：北海道支部2008年冬季研究発表会（札幌、2008年1月30日）、同講演予稿集、p. 93、2008

9) 阿部薫明、小山千佳、江崎光恵、Iosif Danel Rosca、赤坂司、宇尾基弘、森田学、久保木芳徳、亘理文夫：マウス体内での有機・無機微粒子の体内循環挙動の追跡：第20回代用臓器・再生医学研究会（札幌、2008年2月2日）、同講演予稿集、p. 1、2008

## G. 知的所有権の取得状況

無し

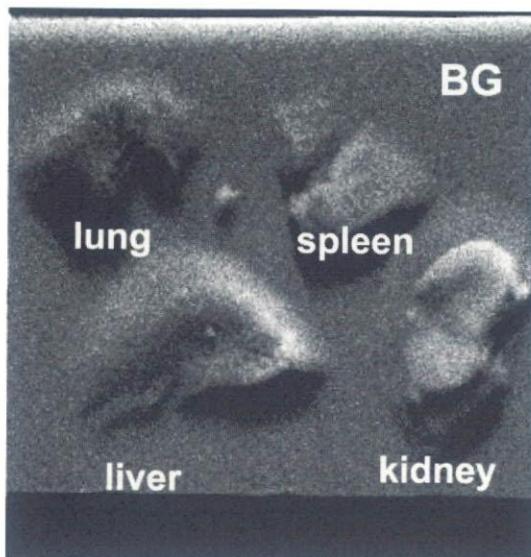


図1-1

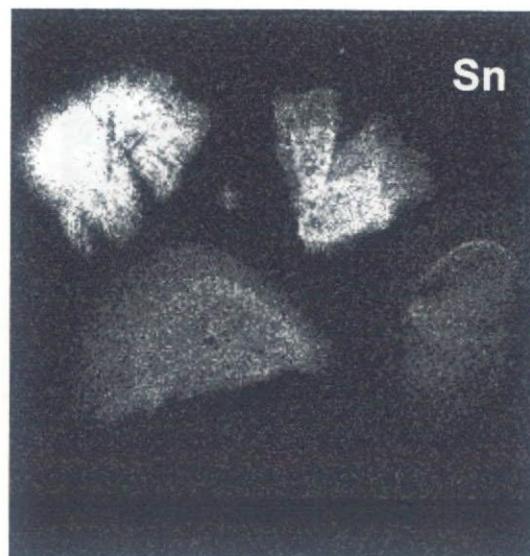


図1-2

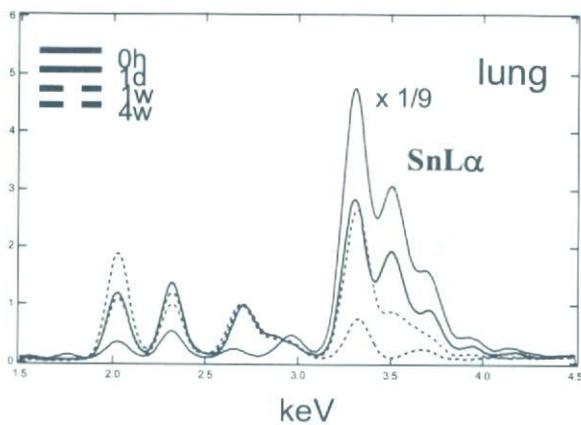


図1-3

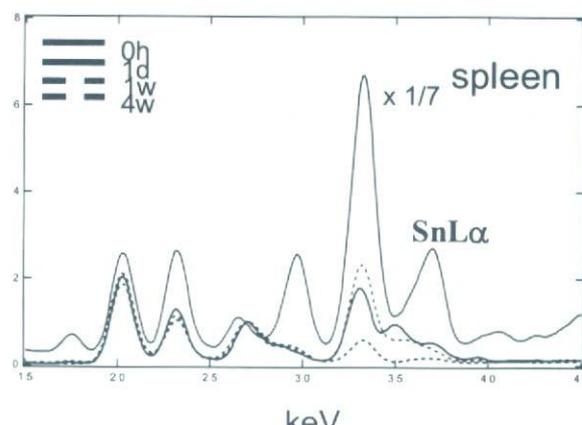


図1-4

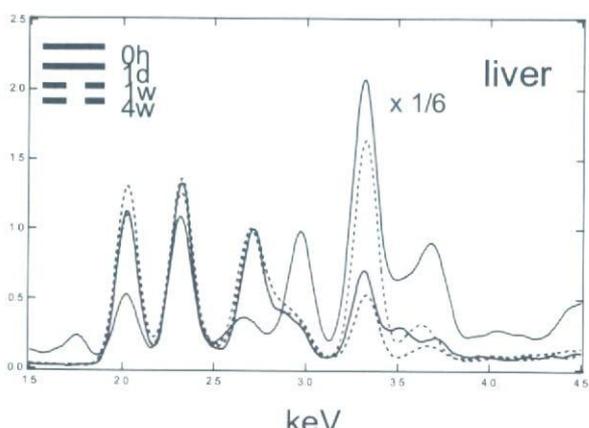


図1-5

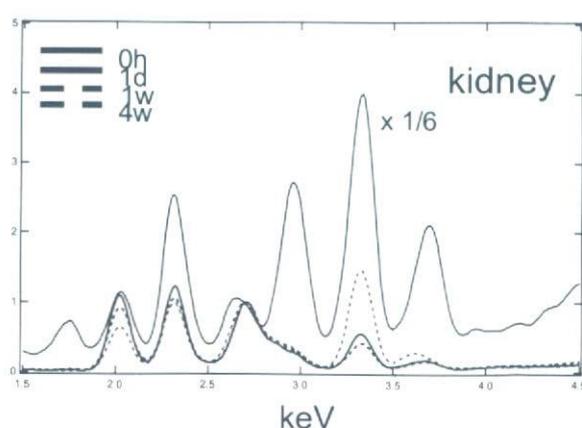


図1-6

図1 XSAMによるITOナノ粒子の体内分布の観察  
 (図1-1:臓器の蛍光X線マッピング像(background)、1-2:(Sn元素)、  
 1-3:蛍光X線分析(肺)、1-4:(脾臓)、1-5:(肝臓)、1-6:(腎臓))

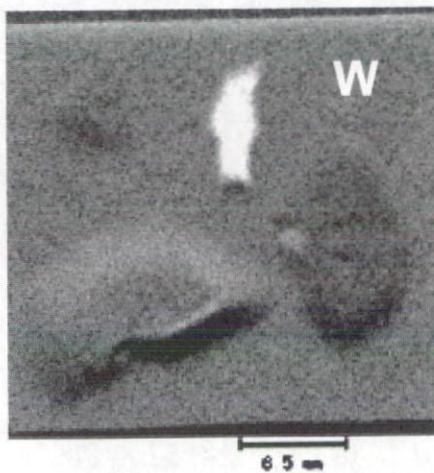


図2-1

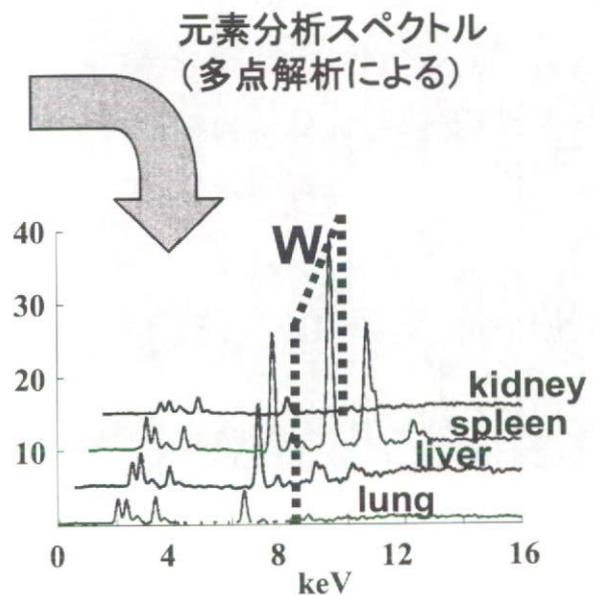


図2-2

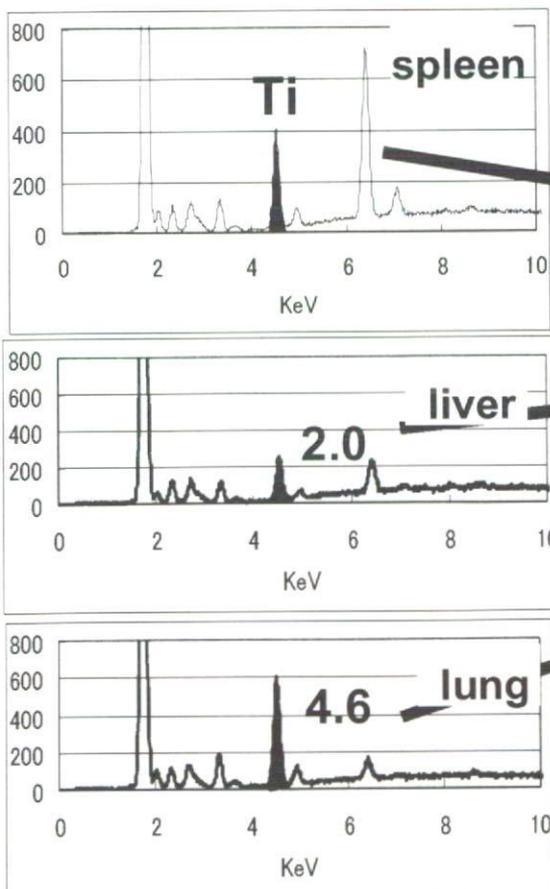


図2-3

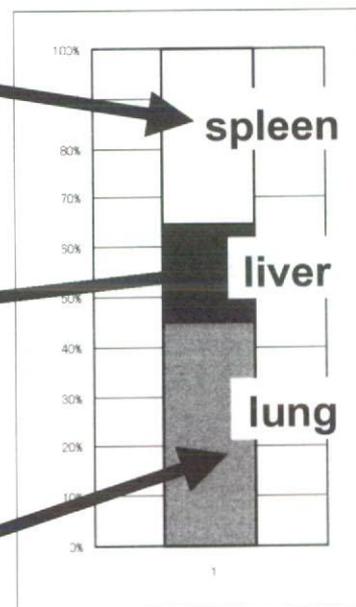


図2-4

経時変化  
を観測

図2 XSAMによる無機粒子の体内分布の相対値・経時変化評価の概念図  
(図2-1: 摘出臓器のマッピング像、2-2: 各臓器の蛍光X線分析結果、  
2-3: target元素の積分値算出、2-4: 相対値算出)

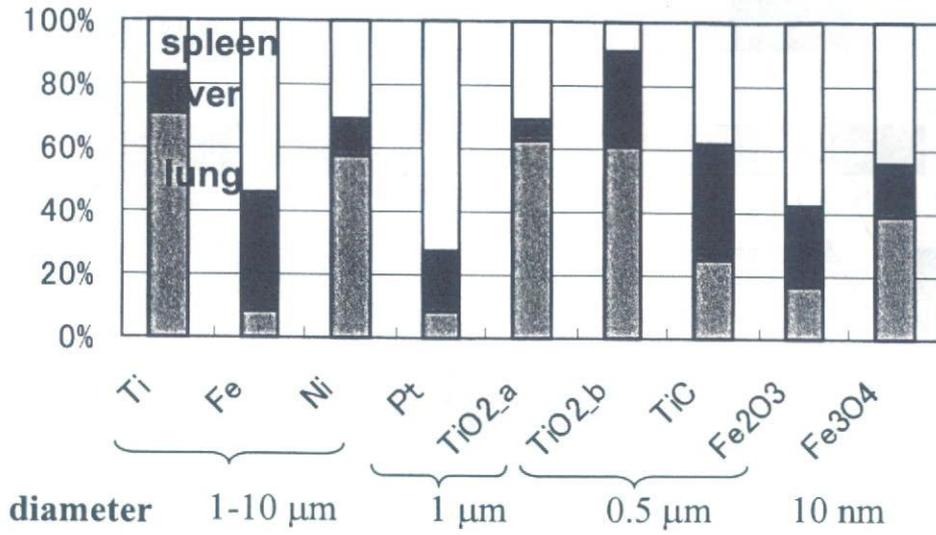


図3-1

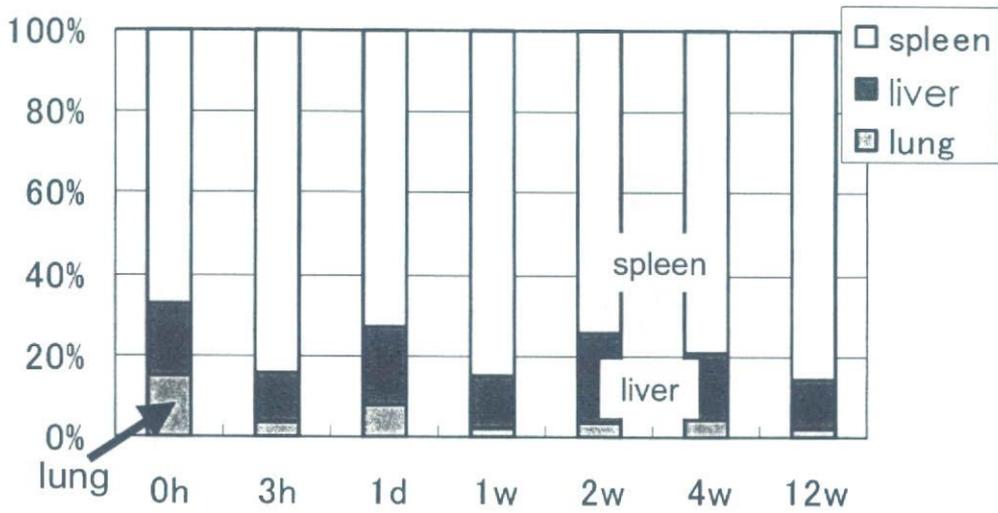


図3-2

図3 XSAMによる無機粒子の体内分布の観測結果  
 (図3-1:投与物質毎の分布の違い(投与後1日)、3-2:Pt投与後の経時変化)

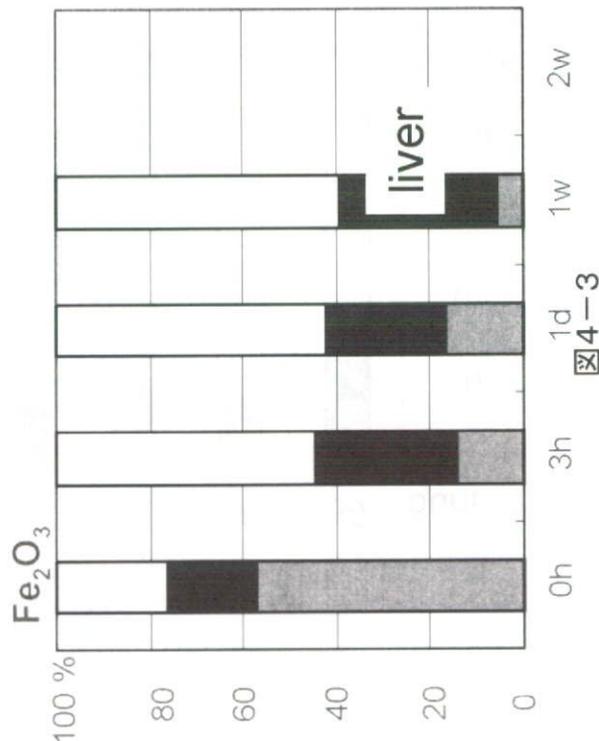
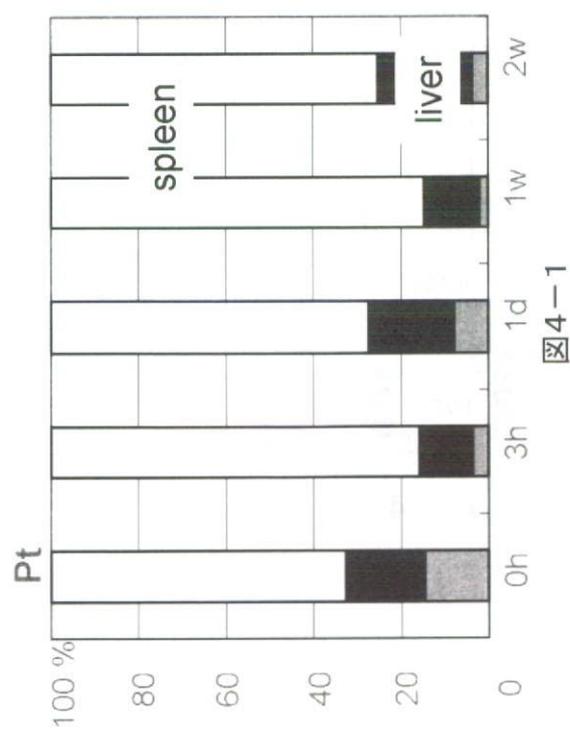
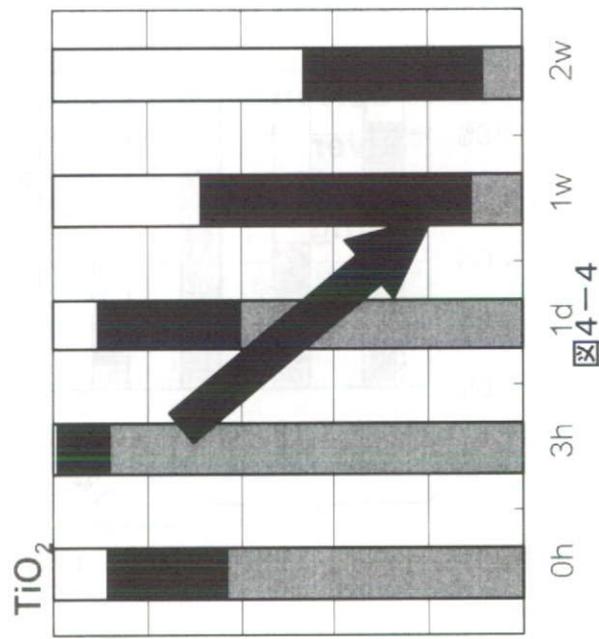
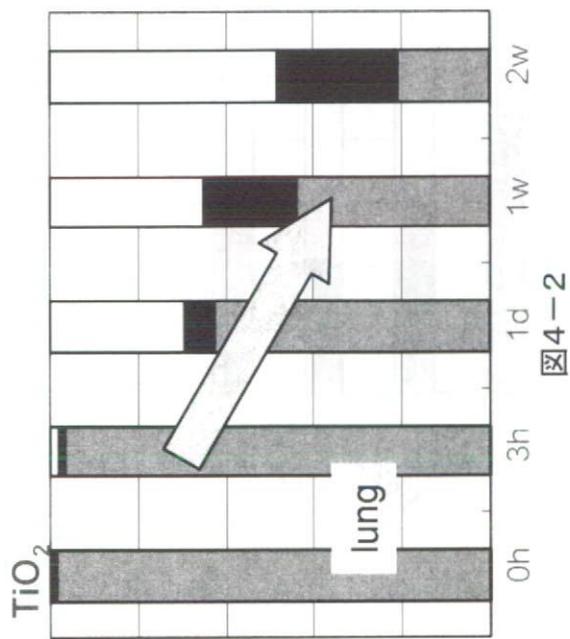


図4 XSAMIによる無機粒子の体内分布の経時変化(化学種・粒子径の違いによる効果)  
 (図4-1: Pt (φ = 1 μm)、図4-2: TiO<sub>2</sub> (φ = 1 μm)、図4-3: Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (φ = 0.5 μm)、図4-4: TiO<sub>2</sub> (φ = 0.5 μm))

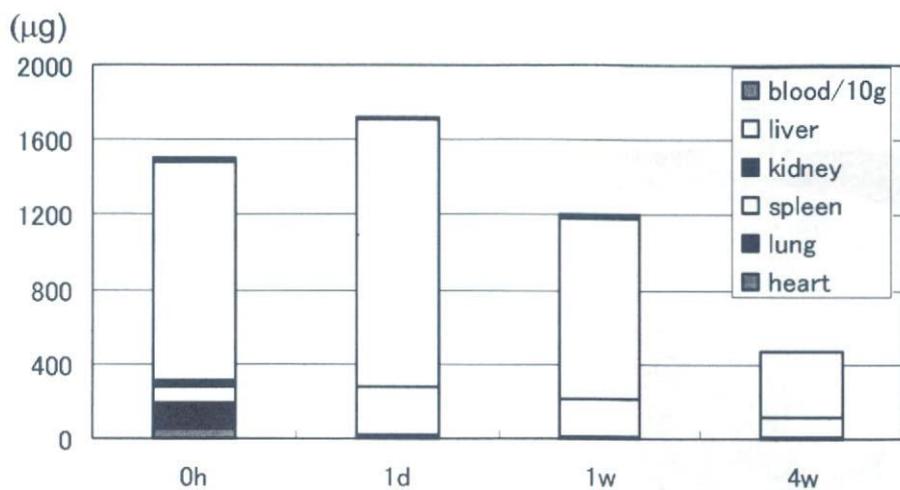


図5-1

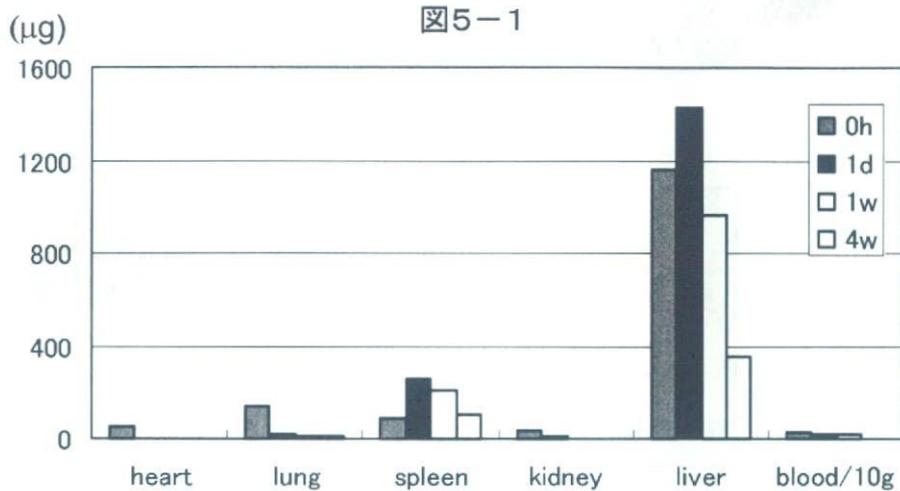


図5-2

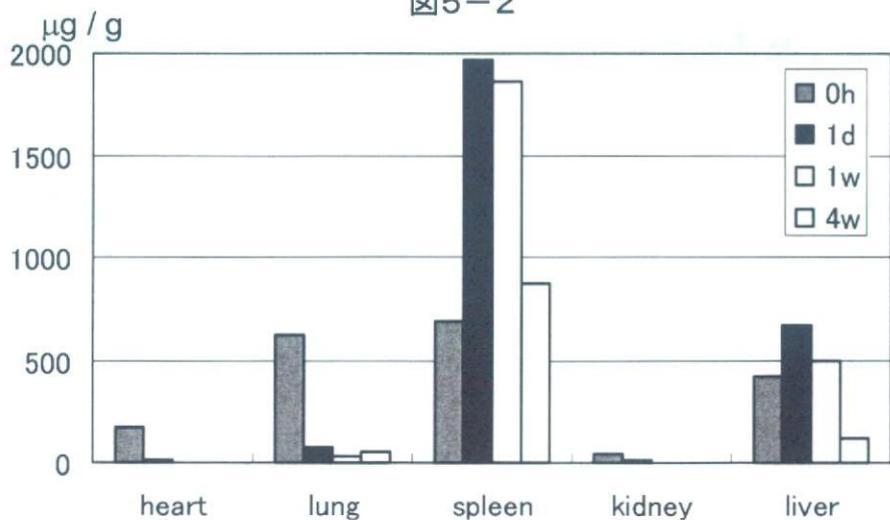
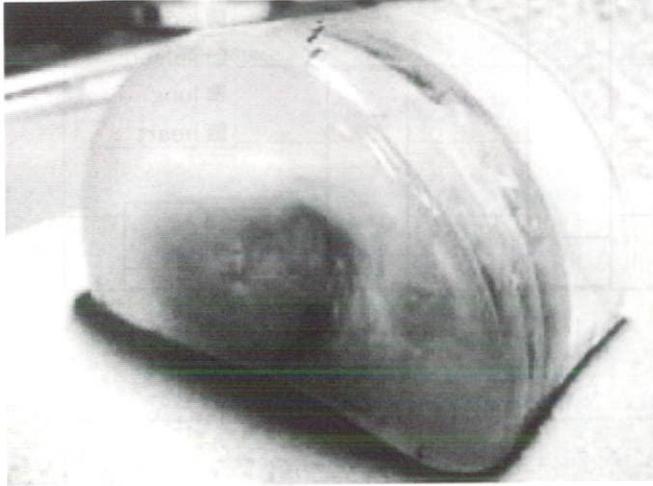
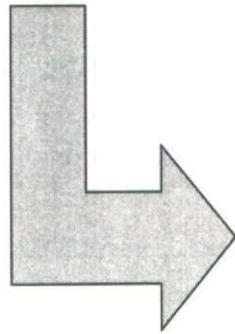


図5-3

図5 ICPによるPt粒子の体内分布の観測結果  
 (図5-1: 検出されたPt総量、5-2: 臓器毎のPt重量の経時変化、  
 5-3: Ptの臓器内濃度の経時変化)



TiO<sub>2</sub>投与後  
樹脂包埋



連続切片化

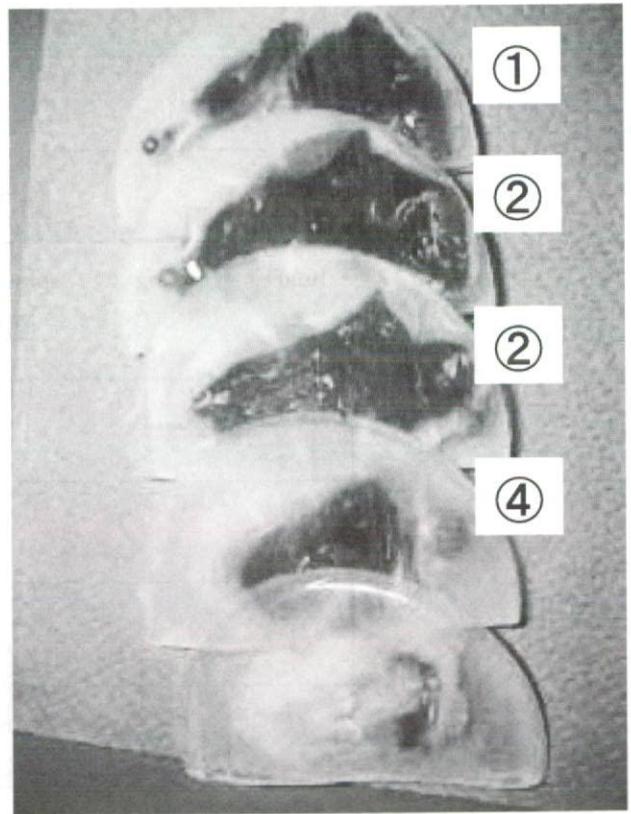


図6 XSAMIによる全身の体内分布観察のための樹脂包埋マウスの連続切片

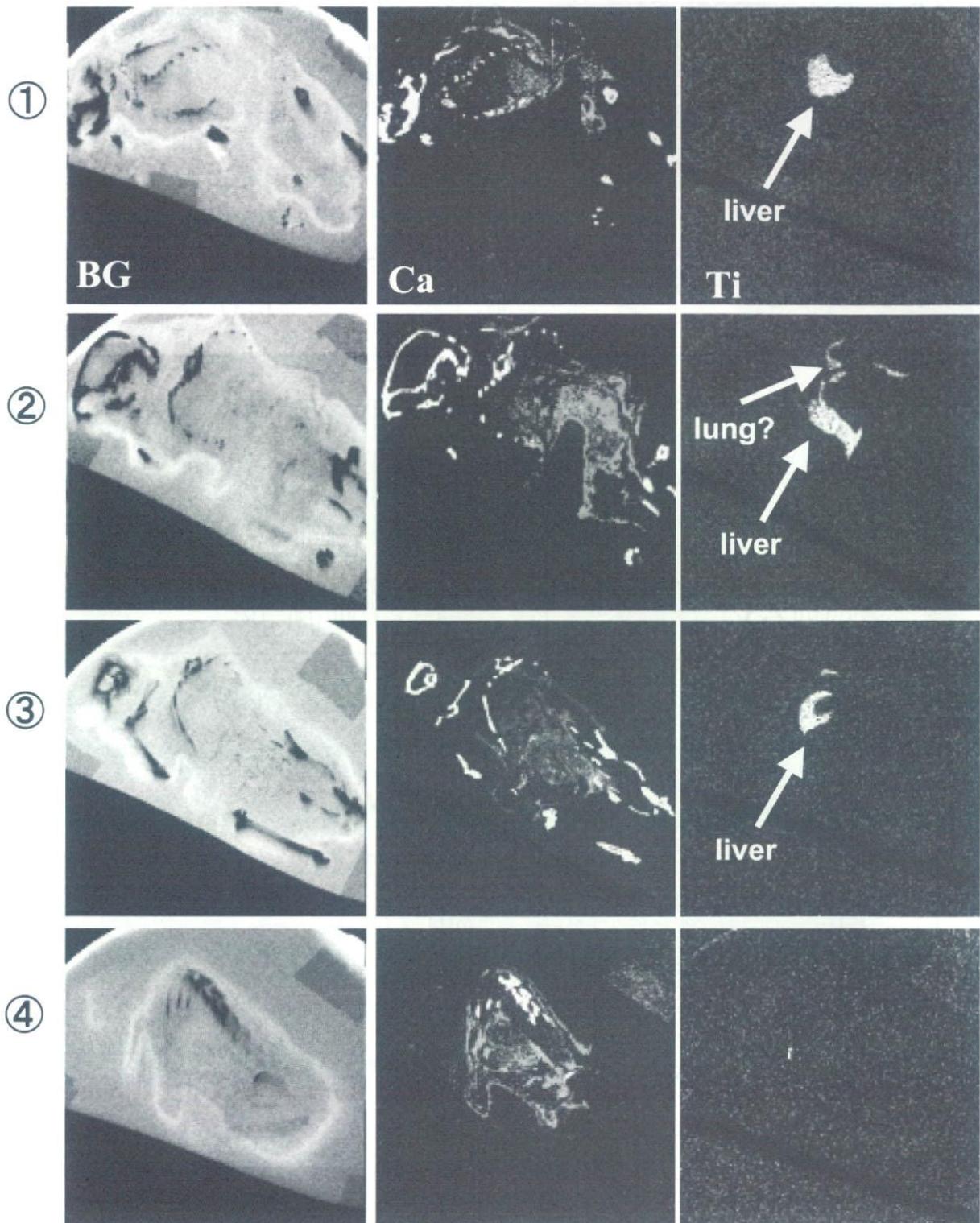


図7 XSAMによるマウス全身(連続切片)の体内分布観察結果(TiO<sub>2</sub>、投与後1日)