

ナノ粒子の有害性評価とリスク対策

技 術 情 報 協 会

[5] 金属ナノ粒子

1. 材料と生体適合性

材料の生体への影響は通常、材料の溶出・イオン化、細胞・組織への吸収のプロセスを経て開始する。したがってすぐれた耐食性は生体親和性を具備するための必要条件であり、材料の生体適合性はまず第一に化学的イオン溶解性に大きく影響される。金属についていえばこの特性はイオン化傾向に対応し、貴金属や不動態を形成する卑金属がインプラントや歯科¹⁾用合金に採用される所以である。ただし生体適合性はこれだけで決まるものではなく、例えば鉄 (Fe) は多量に溶出してもあまり為害性は示さないが、ニッケル (Ni) では溶出量は鉄に比べはるかに少ないものの顕著な為害性を示す。

チタン (Ti)²⁾ は強固な酸化皮膜が不動態を形成して高い耐食性を示し、金属中³⁾最も生体親和性に富むとされ、多くのインプラント⁴⁾に使用されている。イオン溶出が無視し得るほど小さいという必要条件に加え、人工体液に浸漬すると表面にリン酸カルシウムの薄い析出層が形成されることが知られており、これらがすぐれた生体親和性を示現するに至る十分条件を満たすものと言えよう。この意味で Ti は生体材料としてほぼ理想的に見える。しかし必ずしもすぐれた臨床報告ばかりではない。人工関節の骨頭摺動部では摩耗粉を発生しやすく、周囲組織に炎症を誘発することもしばしば報告されている。これは Ti の数少ない欠点の一つである耐摩耗性^{5,7)}に劣る特性のためである。

インプラントに代表される巨視的なマクロサイズでは生体親和性を示すのに対し、摩耗粉のような微視的なマイクロ/ナノサイズでは生体為害性を示す。最近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⁸⁾、長期大量に吸引露曝すると、20～30年経て中皮腫を発症するに至る。こうした現象には単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⁹⁾。

2. 材料 (マクロ) と生体反応 (in vivo)

まず微粒子の生体反応の前提となる通常のマクロサイズ材料に対する組織反応性を示す。図1は各種金属 (a: Ti, b: Fe, c: Ni) をラット皮下に1週埋入した時の周囲軟組織像である。各図の上部の中空領域にインプラントがそれぞれ挿入されていた。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比較的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。Niでは組織が壊死し、強い為害作用を示している。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。

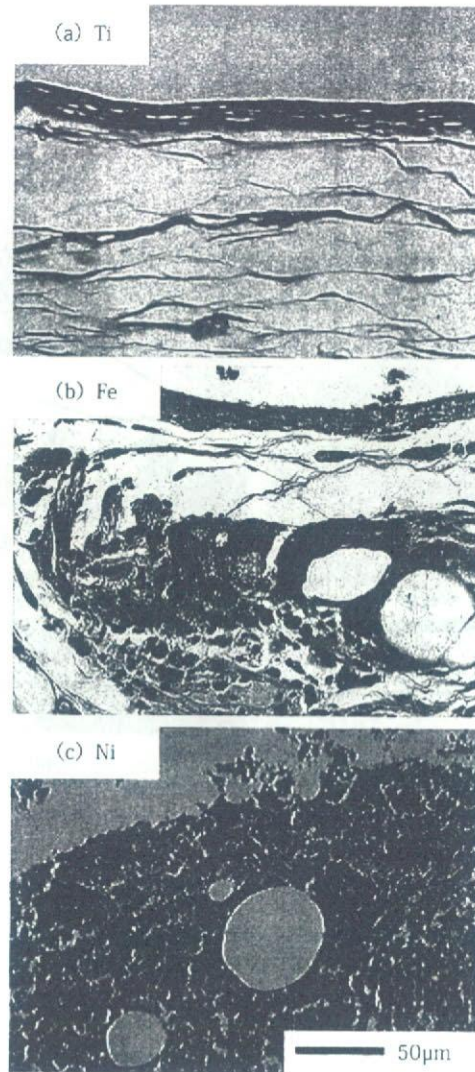


図1 マクロサイズの各種金属 (Ti, Fe, Ni) に対する軟組織の反応 (ラット皮下埋入1週後)
(カラーの図は巻頭ページ参照)

3. マクロ（バルク体）とマイクロ（微粒子）に対する生体反応

次に材料がマクロからマイクロ/ナノ微粒子になったときの in vivo での生体反応性を示す。

図2は同一材料Tiに対するラット埋入10週後の組織反応であるが、マクロサイズ（左）と微粒子（右）に対する反応を比較したものである。マクロサイズ（直径1mmの棒状インプラント）の試料では線維性結合組織が形成され、埋入10週経過後、結合組織は菲薄化して沈静化している。一方、3 μ m 微粒子では強拡大像に示すように巨食細胞による貪食を繰り返し、組織は長期経過後も慢性的な炎症症状を示す。

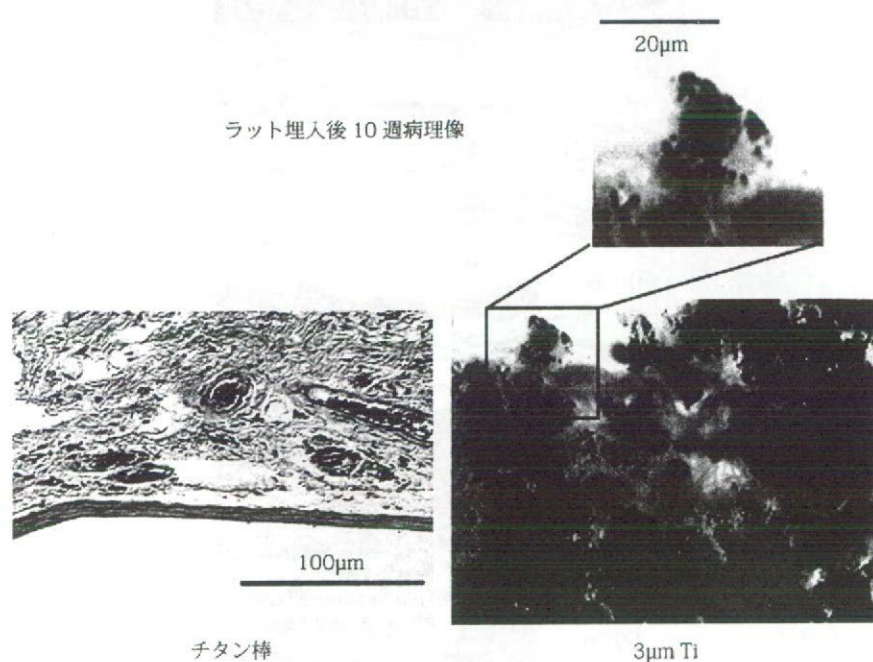


図2 Tiに対する組織反応。マクロサイズ（左）と微粒子（右）（ラット埋入10週後）
（カラーの図は巻頭ページ参照）

4. 生体適合性の微粒子サイズ依存性 (in vitro)

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解析した結果を示す。

図3はサイズの異なる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IL-1 β 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。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を示す最も代表的な指標の一つである。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、IL-1 β 産生は徐々に増加するが、特に 10 μm を切ると急激な増大を示している。

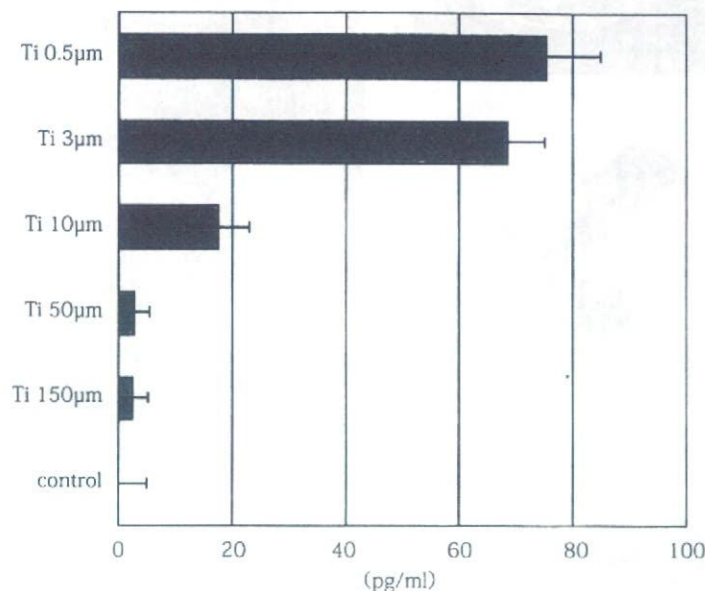


図3 ヒト好中球からのサイトカインIL-1 β 産生のTi微粒子サイズ依存性³⁰⁾

同様に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) の活性値や活性酸素産生量、さらに IL-1 β とともに代表的な炎症性サイトカインの 1 種 TNF- α もともに類似の微粒子サイズ依存性を示し、Ti 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 μm 以下で増幅されることがわかる。とりわけ TNF- α は IL-1 β よりもさらに急激な 10 μm 以下での産生増大を示した。

図4はこれらの液中での好中球の形態を観察したものである。図4aはHBSS溶液中での通常の好中球のSEM像(コントロール)であり、c(0.3 μmTiO_2)とd(0.5 μmTi)は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。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。図4b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。こうした好中球による貪食像は3 μm 以下の粒子でのみ観察され、10 μm 以上の粒子では観察されなかった。

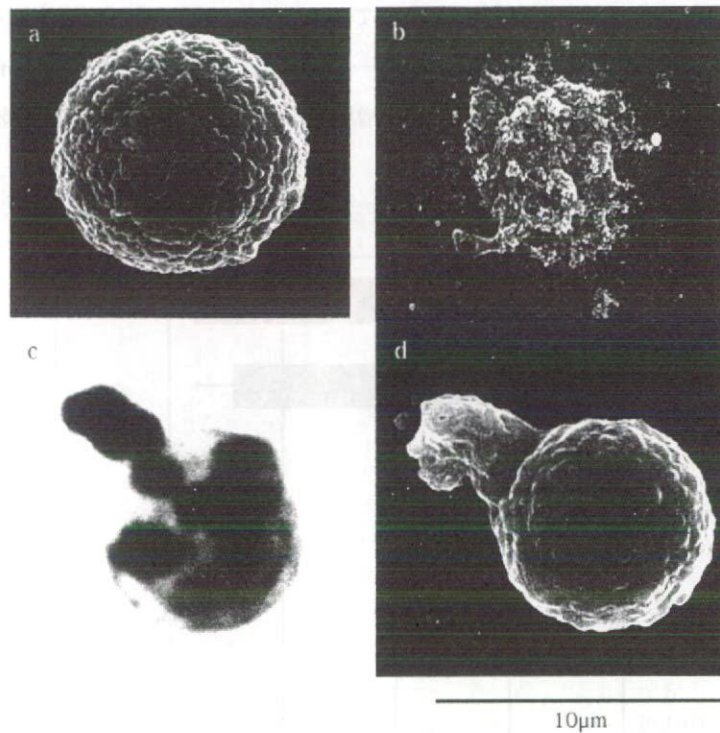


図4 各種微粒子に対するヒト好中球の反応：SEM像および光顕像 (c)。
a：コントロール，b：Ni (0.5 μ m)，c：TiO₂ (0.3 μ m)，d：Ti (0.5 μ m)³⁰⁾

図3に見られた10 μ m以下の粒子で発現したIL-1 β や活性酸素、TNF- α の急激な放出増大は、図4に示された3 μ 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5～10 μ mであり、3 μ m粒子は貪食可能であるが、10 μ 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、図1のように比較的良好な生体適合性を示すFeでも溶解度等の化学的性質は異なるがTiと同様な傾向が得られた。Ti、Fe等の金属、TiO₂、カーボンナノチューブ^{10,21)}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。

5. 微粒子の生体反応 (in vivo)

5.1 微粒子と生体適合性 (in vivo)

図5はラット軟組織にTi (a), Fe (b), Ni (c) の各金属微粒子を1週埋入したときの生体反応を強拡大し細胞のレベルで示したものである。Ti と Fe では貪食作用により細胞内に取り込まれており、Ni では強い為害性のために組織は壊死し細胞死が生じている。図4の in vitro 試験と反応の様子がよく一致している。

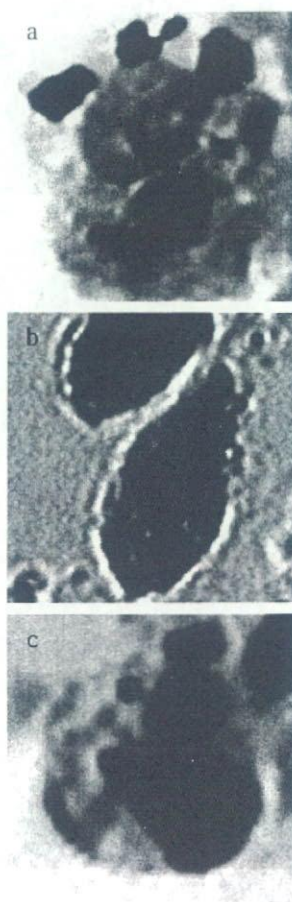


図5 ラット軟組織に1週埋入後の各種金属微粒子に対する細胞の反応拡大像。a : Ti, b : Fe, c : Ni
(カラーの図は巻頭ページ参照)

5.2 長期埋入試験

5.2.1 微粒子サイズ効果

図6はラット軟組織にTi (a), Fe (b), Ni (c) の各金属微粒子を長期 (6 ヶ月～1 年) 埋入したときの生体反応である。Ti の場合、微粒子サイズがおよそ $100\mu\text{m}$ 以上では線維性結合組織によって微粒子が個々に被包化され、炎症を呈することなくインプラントのようなマクロサイズと同様、生体親和性を示した。10 ～ $100\mu\text{m}$ 粒子では粒子群中に線維性結合組織と炎症性細胞浸潤がともに生成し、長期慢性的な症状を継続した。3 μm ～ 500nm 微粒子では炎症細胞による貪食、細胞内濃縮を繰返し、次第に凝集し、やがて線維性結合組織で周囲を覆われ粒子群として凝集する。しかし周囲に取りこぼしがあり、炎症は長期間持続した (図 6a)。

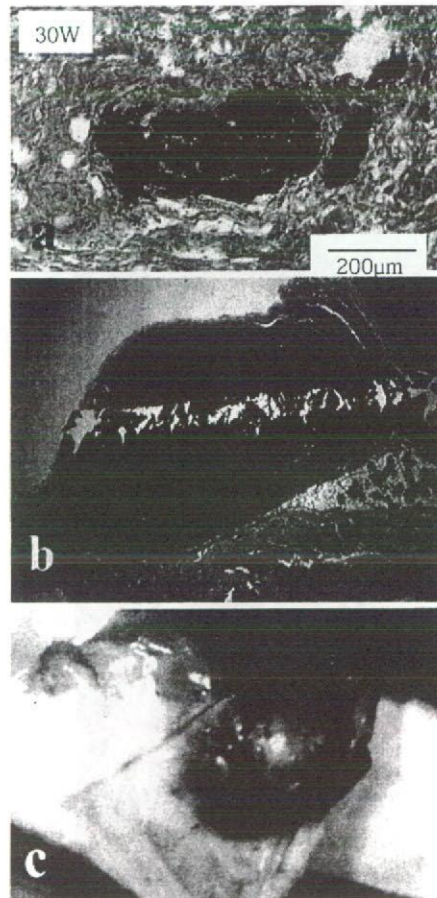


図6 ラット軟組織に長期 (6 ヶ月～1 年) 埋入後の各種金属微粒子に対する反応。a : Ti, b : Fe, c : Ni
(カラーの図は巻頭ページ参照)

5.2.2 比表面積効果

溶解性の高い Fe では 6 ヶ月後、線維性結合組織で一旦被包化されるが、イオンはその障壁を越えて拡散し周囲組織に析出生成物が沈着し広範に分布した (図 6b)。短期的には Fe はイオン溶出しやすいにもかかわらず、生体親和性を示して影響は比較的小さいが (図 1b, 図 5b)、長期にわたる組織への残留は持続的に大量のイオン溶出を継続するため、為害性を呈するに至り、重篤な傷害をもたらす可能性も考えられる。

0.5 μm Ni 粒子の場合、埋入直後から強い反応を惹起し炎症性細胞浸潤を引き起こした。イオン溶出が継続するため、1 ヶ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た。図 6c は 1 年後の結果で、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。

5.3 ナノ微粒子の刺激性と体内侵入

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 μm 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 μm) 以下になると刺激性が昂進し、 μm 前後～0.5 μm 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。

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体内侵入を許してしまうということにも通ずる。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、呼吸にのって肺胞に到達し、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た。さらに体内全身の XSAM (X 線走査型分析顕微鏡)^{22,24)} による Ti 元素マッピングを行うと、全身に拡散し臓器に濃縮していることがわかる。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。30nm ナノ微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。

5.4 微粒子の全身動態²⁵⁾

こうしたナノ/マイクロ微粒子の全身動態を可視化するために、尾静脈から血流に直接注入し開腹した後、XSAM 元素マッピングにより各粒子の全身分布イメージングを記録した。図 7 は尾静脈注入 1 日後の 3 μm Fe 微粒子の体内分布を XSAM による投与マウスの透過エックス線像

と元素マッピング像を比較して示したものである。Fe を含む多くの微粒子で尾静脈から投与後数分で肺に到達し、その後数時間かけ徐々に肝臓に移行し、1 日後肺における残留濃度は低下し、4 週経過時ではほぼ肝臓のみから信号が検出された。微粒子の種類により動態に差異も示し、Fe では長期経過後、脾臓に高濃度に滞留した。

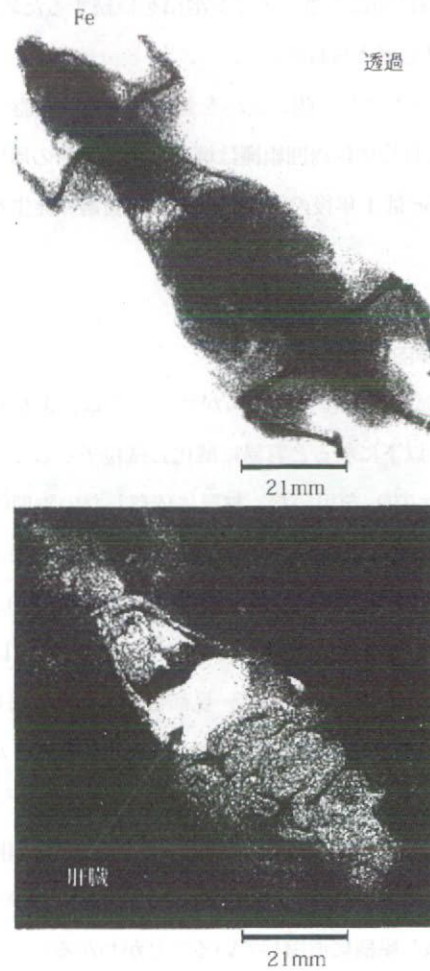


図7 尾静脈注入後のFe微粒子の全身動態 - XSAMによる投与マウスの透過エックス線像と元素マッピング像

6. 結論—ナノサイジング効果^{26,27)}

6.1 比表面積効果—材料に由来する効果

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。同一重量でも微粒子になると表面積はサイズに反比例して増加し、超微小粒子では比表面積が著しく増加するから、化学反応もまた著しく増大することになる。マクロでの材料の生体適合性に影響が大きいイオン溶出性に関連する効果はこれに該当する。溶出性材料である Fe, Ni において図 1 のマクロでの反応に対して、図 6 の微粒子に対する反応では著しく為害性が増悪している例がそうである。例えばもともとマクロでアレルギー性を示す Ni がマイクロ/ナノ微粒子になると著しく為害性が昂進し、図 6 に示したように 1 年後には腫瘍を生成したがこの結果は比表面積効果の典型的な例である。このように比表面積効果は強い影響をもたらす。②表面原子の占める割合が無視し得なくなり物性が変化する、さらに 1nm 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、③ある種の触媒に見られるような特異な活性点形成による反応活性化などもナノサイジングの効果であり、これらはいずれも材料自体にその原因が由来する効果である。

6.2 微粒子サイズ効果—生物学的プロセスによる刺激性²⁸⁻³¹⁾

生体反応性に及ぼす影響はこれに留まらない。材料と細胞・組織との相対的な関係に起因する効果が出現する。④サイズ効果、⑤形状効果はこれに当たる。これらは化学的性質に基づく材質由来の効果—材料の特性とは独立に現れる物理的效果である。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ことと、マイクロ/ナノサイズ化しても多くの場合、材料はイオン溶出性であり、比表面積効果の影響が大きいために、この効果は認識しにくいことが多い。例えば Ni 微粒子も図 3 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效果は弱いか、ほとんど無視し得るために、図 2 の *in vivo* 観察、図 3 の *in vitro* 試験で示した Ti のように、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效果が単独で発現し、純粋なサイズ効果として顕在化する。

6.3 生体適合性に及ぼす物理的サイズ効果の特徴^{9,32)}

in vitro, *in vivo* 試験の結果を総合すると、およそ 100 μ m 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 μ m 以下では刺激性が亢進し、特に 10 μ m 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 な材料共通に同様に認められ、材料に非特異的に起きる効果である。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し、生物学的プロセスが関与して刺激性が発生する効果である。即ち、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、 $\mu\text{m} \sim \text{nm}$ 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、その有害性の程度は 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、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⁹⁾。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り、図 6a に見られた $3\mu\text{m}$ Ti 微粒子の長期埋入に伴う粒子群の凝集化の進行は主としてこうした生物学的プロセスの関与によるものである。また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、人工関節周囲組織の骨溶解 (Osteolysis) や 20 ~ 30 年かけて中皮腫を発症するに至るアスベスト病などの発症にはこうした効果がベースになっている。

6.4 ナノ微粒子の体内侵入

化粧品に使われている 30nm の TiO_2 粒子のように、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、全身への拡散を経て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⁹⁾。

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、一方意図せずして有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。材料のナノサイジングは新たな機能性を産み出すことからナノテクノロジーの展開が図られているが、一方でナノ微粒子は人体が生体防御機構の対象として想定してこなかった新たな異物であり、組織傷害性もまた昂進する可能性がある。今後のナノテクノロジーの本格的なバイオ応用開発には、ナノ/マイクロ微粒子の生体および環境への影響とその注意点を把握しておくことが必須である所以である^{33,34)}。

謝辞

本研究の一部は厚生労働科学研究補助金 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」(H18-化学-一般-006) の助成を得て行われた。

文 献

- 1) F. Watari: In situ quantitative analysis of etching process of human teeth by atomic force microscopy, *J. Electron Microscopy* 54 (3) : 299-308, 2005
- 2) M. Uo, K. Asakura, A. Yokoyama, K. Tamura, Y. Totsuka, T. Akasaka, F. Watari :Analysis of Titanium Dental Implants Surrounding Soft Tissue Using X-ray Absorption Fine Structure (XAFS) Analysis, *Chem. Lett.* 34 (6) , 776-777, 2005
- 3) H. Matsuno, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, T. Kawasaki: Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium, *Biomaterials* 22, 1253-1262, 2001
- 4) F. Watari, A. Yokoyama, M. Omori, T. Hirai, H. Kondo, M. Uo, T. Kawasaki: Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for bio-medical application, *Composites Science and Technology* 64 (6) , 893-908, 2004
- 5) Y. Tamura, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, T. Kawasaki: Mechanical properties of surface-nitrided titanium for abrasion resistant implant materials, *Mat. Trans.* 43 (12) , 3043-3051, 2002
- 6) Y. Tamura, A. Yokoyama, F. Watari, T. Kawasaki: Surface Properties and Biocompatibility of Nitrided Titanium for Abrasion Resistant Implant Materials, *Dent. Mat. J.* 21 (4) , 355-372, 2002
- 7) Y. Zhu, F. Watari : Surface Carbonization of Titanium for Abrasion-resistant Implant Materials, *Dent. Mat. J.* 25 (2) , 244-252, 2007
- 8) F. Watari, M. Inoue, T. Akasaka, N. Sakaguchi, H. Ichinose, M. Uo: Comparison of morphology and behavior of carbon nanotubes and asbestos, *Proc. 6th Asian BioCeramics Symp.* 2005, p.142-145 (2006)
- 9) F. Watari, K. Tamura, A. Yokoyama, K. Shibata, T. Akasaka, B. Fugetsu, K. Asakura, M. Uo, Y. Totsuka, Y. Sato, K. Tohji: Biochemical and pathological responses of cells and tissue to micro- and nanoparticles from titanium and other materials, *Handbook of Biomineralization Vol. 3*, Ed. E. Bauerlein, Wiley-VCH, Weinheim, p.127-144 (2007)
- 10) 佐藤義倫, 宇尾基弘, 横山敦郎, 柴田健一郎, 亘理文夫, 田路和幸: カーボンナノチューブと金属内包カーボンナノカプセルの毒性評価, *表面* 44 (3) , 87-103, 2006
- 11) 佐藤義倫, 横山敦郎, 柴田健一郎, 亘理文夫, 田路和幸: 炭素, 225, 364-372, 2006
- 12) M. Ushiro, K. Uno, T. Fujikawa, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, W. Chun, Y. Koike, K. Asakura: X ray absorption fine structure (XAFS) analyses of Ni species trapped in graphene sheet of

carbon nanofibers, *Phys.Rev.B* 73, 144103/1-11 (2006)

- 13) N.Aoki, A.Yokoyama, Y.Nodasaka, T.Akasaka, M.Uo, Y.Sato, K.Tohji, F.Watari: Strikingly EXTended Morphology of Cells Grown on Carbon Nanotubes, *Chem.Let.* 35 (5) , 508-509, 2006
- 14) T. Akasaka, F. Watari: Nano-architecture on Carbon Nanotube Surface by Biomimetic Coating, *Chemistry Letters* 34 (6) , 826-827,2005
- 15) A.Yokoyama, Y. Sato, Y. Nodasaka, S.Yamamoto, T.Kawasaki, M. Shindoh, T.Kohgo, T. Akasaka, M.Uo, F.Watari, K.Tohji: Biological Behavior of Hat-stacked Carbon Nanofibers in the Subcutaneous Tissue in Rats, *Nano Letters* 5 (1) , 157-161, 2005
- 16) I.D.Rosca, F. Watari, M. Uo, T. Akasaka: Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid, *Carbon* 43 (2005) 3124-3131
- 17) K.Kiura, Y. Sato, M. Yasuda, B. Fugetsu, F. Watari, K.Tohji, K. Shibata: Activation of Human Monocytes and Mouse Splenocytes by Single-Walled Carbon Nanotubes, *J. Biomed.Nanotechnology* 1 (2005) 359-364
- 18) Y.Sato, A. Yokoyama, K. Shibata, Y.Akimoto, S. Ogino, Y. Nodasaka, T.Kohgo, K .Tamura, T.Akasaka,M. Uo, K.Motomiya, B.Jeyadevan,M.Ishiguro,R. Hatakeyama,F. Watari,K. Tohji: 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.* 1 ,2005,176-182
- 19) N.Aoki, A.Yokoyama, Y.Nodasaka, T.Akasaka, M.Uo, Y.Sato, K.Tohji, F.Watari: Cell Culture on a Carbon Nanotube Scaffold, *J.Biomed.Nanotechnology* 1 (4) , 402-405, 2005
- 20) W.Wang, M.Omori, F.Watari, A.Yokoyama: Novel Bulk Carbon Materials for Implant by Spark Plasma Sintering, *Dent.Mat.J*, 24 (4) , 478-486, 2005
- 21) T.Akasaka, F. Watari, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, Apatite formation on carbon nanotubes, *Material science & Engineering C* 26, 675-678 (2005)
- 22) M.Uo, F.Watari, A.Yokoyama, H.Matsuno, T.Kawasaki: Dissolution of nickel and tissue response observed by X-ray analytical microscopy, *Biomaterials* 20 (8) , 747-755, 1999
- 23) M.Uo, F.Watari, A.Yokoyama, H.Matsuno, T.Kawasaki: Tissue reaction around metal implants observed by X-ray scanning analytical microscopy, *Biomaterials* 21, 677-685, 2001
- 24) M.Uo, F.Watari, A.Yokoyama, H.Matsuno, T.Kawasaki: Visualization and detectability of rarely contained elements in soft tissue by X-ray scanning analytical microscopy and electron probe micro analysis, *Biomaterials* 22, 1787-1794, 2001

- 25) 亘理文夫 (編者): 厚生労働科学研究補助金 化学物質リスク研究事業 平成 18 年度 総括・分担研究報告書「ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発」, p.1-232, 2007
- 26) 亘理文夫 (編者): 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 ナノメディスン分野 平成 14 ~ 16 年度総合研究報告書 「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」, p.1-377, 2005
- 27) 亘理文夫 (編者): 同 平成 16/15/14 年度 総括・分担研究報告書, 一各年度毎一 (平成 16 年度) p.1-227, 2005 / (平成 15 年度) p.1-262, 2004 / (平成 14 年度) p.1-168, 2003
- 28) 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 20 (6) , 356-365, 2001
- 29) R.Kumazawa, F.Watari, N. Takashi, Y.Tanimura, M.Uo, Y.Totsuka: Effects of Ti ions and particles on cellular function and morphology of neutrophils, Biomaterials 23, 3757-3764, 2002
- 30) K.Tamura, N. Takashi, R.Kumazawa, F.Watari, Y.Totsuka: Effects of particle size on cell function and morphology in titanium and nickel, Mat.Trans. 43 (12) , 3052-3057, 2002
- 31) 亘理文夫, 田村一央, 高師則行, 宇尾基弘, 赤坂 司, 戸塚靖則, 古月文志, 佐藤義倫, 田路和幸: 微粒子と生体反応, ナノ学会会報 2 (1) , 33-37, 2003
- 32) 亘理文夫: 材料のナノサイジングと生体反応性, バイオマテリアル-生体材料- 24 (5) , 300-310, 2006
- 33) 亘理文夫 (編者)「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」研究会抄録集, 第 1 回 (H17/12/12, 仙台) p.1-35, 2005/ 第 2 回 (H18/6/22-23, 札幌) p.1-45, 2006/ 第 3 回 (H18/12/11-12, 仙台) p.1-33, 2006
- 34) 亘理文夫: ナノテク以後, バイオマテリアル-生体材料- 24 (4) , 235-236, 2006

Handbook of
Nano Carbon
ナノカーボン 遠藤守信 / 飯島澄男 監修 ハンドブック

エヌ・ティー・イス

6節 CNTの生体影響 (*in vitro*)

1 ナノ微粒子と生体反応性

材料のナノ/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。材料の生体への影響は通常、イオンとして溶出し細胞・組織に吸収されることから開始する。したがってインプラントのようなマクロサイズで使用されるバイオマテリアルの多くは溶出性の低いもの、金属でいえばイオン化傾向の小さい貴金属や不動還元酸化皮膜を形成するTi等が使われることが多い。イオン溶出等の化学反応は表面を介して進行し、マイクロナノサイズ化により、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いたるが、こうした著しい毒性の昂進が発現する現象の多くはイオン溶出に関連した比表面積増大効果に由来するものであり、Niはその典型例である¹⁾。

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優れた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年を経て中皮腫を発症するにいたる。バイオイナートな材料が為害性に働くこうした現象には、為害性からより強い為害性へ同種の特性が昂進する比表面積効果では説明困難なある種の機能性転換がみられ、材質が毒性か生体親和性かという特性とは別に、微粒子のサイズ、形状に起因する効果が寄与していると考えられる²⁾。

2 CNTと安全性—アスベストとの共通性

CNTは直径がnmオーダーで長さが多くの場合 μm 以上の繊維状・針状の形態異方性を有するナノ/マイクロ微粒子である。材質的には純炭素で基本的にはバイオイナート(生体不活性)であり、

イオン溶出等の化学的特性の影響が小さく、微粒子サイズや形状等の物理的特性の影響がマイクロ/ナノサイズにおける刺激性の主要な要因になると考えられる。

現在まで主として電子エミッタ、燃料電池など電子、化学分野で注目されており、バイオ応用に注目した研究はほとんどなされていない。欧米からは肺癌誘発性のあるアスベストとの形状の類似性の連想から、ナノトキシコロジーの代表的な例として重大な為害性の可能性があるという論調が出されてきている³⁾。

アスベストの発癌性の要因として考えられる特性をCNTと比較すると、以下の点で共通点がある。

- ① 肺胞に到達し得る微粒子サイズである。
- ② 繊維状ないし針状微粒子であり、アスペクト比が大きい。
- ③ 体内で非分解性である。

3 無処理CNTと高純度化処理後CNT

このような観点からCNTの応用にあたっては、あらかじめ安全性を検討する必要がある。CNTの被曝量が最も高いのは生産工場であり、無処理(作製時のまま)のCNTの健康への影響が問題になる。通常の工業的用途には作製時の状態でそのまま使用されることが多いと考えられ、日常大衆商品として大量に使用され、環境に放出される場合にはその分解性に依りて環境への影響が問題になる。より直接的にバイオ応用を図る場合、とりわけ人間に対する応用には必要な処理をした状態でのCNTの生体適合性を調べる必要がある^{4,5)}。

作製時のままのCNTは触媒として用いられるNi⁶⁾、Fe等の金属微粒子と、アモルファスカーボンその他結晶構造の異なるカーボンとの混合物である。CNTの含有率は、とくに単層CNTの場合、必ずしも高くないこともある。また応用にあたっては凝集性が高くバンドルを形成しやすいために、分散・溶解性を改善する界面活性剤が使用されることが多い。CNT自体はバイオイナートであり、為害性としてはこれら触媒や界面活性剤の方が急性で高いことが多い。

したがって生体適合性やバイオ応用特性を評価

するには、CNT本体と付随物の影響を区別する必要がある。CNTを生産する工場環境や工業的用途での健康影響は、これら触媒や界面活性剤を含有する工場作製・出荷時、あるいは使用状態時のCNTを調べることが必要であり、バイオ応用には金属触媒を強酸で溶解し、アモルファスカーボンを焼却除去し高純度化したCNTを使用する必要がある⁷⁾。本稿では以下、高純度化処理した多層CNTについての特性を述べる。単層CNTや派生体の一種カーボンナノファイバー(CNF)⁷⁾についても同様な実験を行っているが、定量的な差異はあるもののおおよその定性的な特性は類似している。

4 *in vitro*細胞機能性試験の微粒子サイズ依存性(一般)

まずマイクロ/ナノ微粒子一般における生体反応性を*in vitro*細胞機能性試験の結果で見てもよい。図1は各種微粒子に対する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一種である。サイトカインは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す、細胞から放出され

る比較的低分子量のタンパク質で、多数存在するがTNF- α は代表的な炎症性サイトカインの一種である。

図1においてTiがマクロ(シート状または棒状)から微粒子サイズ150~0.5 μ mへと順次減少するとともにTNF- α 産生は増加し、とくに10 μ m以下で急激に増加している⁸⁾。

このとき好中球の形態を観察すると、3 μ m以下のTi粒子でのみ好中球による貪食像が観察される。好中球の大きさは約5~10 μ mであり、3 μ m粒子は貪食可能であるが、10 μ m以上の粒子では困難である。10 μ m以下のTNF- α 産生の急激な増加は、サイズが細胞以下の微粒子に対して貪食作用が誘発され、著しく刺激性が昂進するためと考えられる。

また細胞生存率、乳酸脱水素酵素(LDH)、活性酸素、IL-1 β ほかの炎症性サイトカインの産生等の細胞機能性の各種指標について試験するといずれも同様な微粒子サイズ依存性を示す⁹⁾。Ti微粒子サイズが小さいほど刺激性が増加し、細胞が異物とみなして反応することが分かる。

以上の条件下でTi微粒子からの溶出量をICP元素分析で調べると検出限界値以下であり、イオン溶出は無視できる。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・形状に由来する効果である¹⁰⁾。このような現象は溶解度等の化学的性質は異なるが、短期的

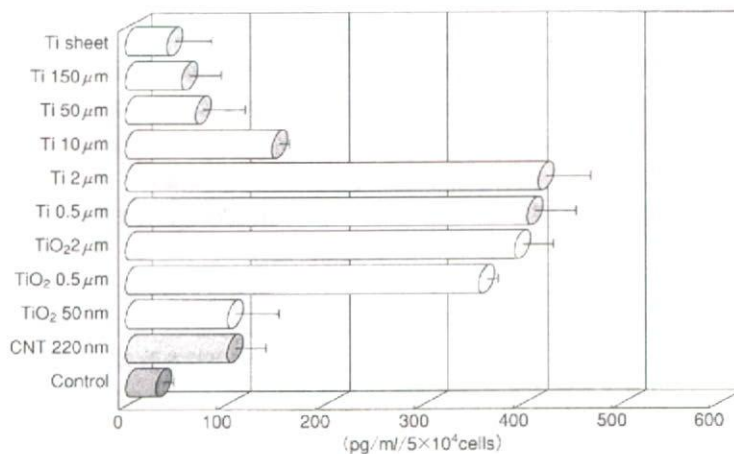


図1 ヒト好中球からのサイトカインTNF α 産生の微粒子サイズ依存性¹⁾

試験で比較的良好な生体適合性を示すFeでも同様にみられ、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におけるバイオアクティブ、バイオイナートな材料のいずれにも共通に認められる、イオン溶出等の化学的特性とは独立な、材料に非特異的に起きる効果である。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効果である^{1, 2, 11)}。

図1において0.5 μm以下になると金属Tiは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るので、さらに小さい微粒子としてTiO₂を用いている。材料に依存しない物理的サイズ効果を反映し、同一サイズで比較すると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μm前後～0.5 μm付近を頂点として200nm付近以下になるとむしろ低下し、50nmのTiO₂ではかなり低いレベルになる¹⁾。

5 CNTの*in vitro*生体反応性

(1) サイズ依存性

強酸中での超音波照射による切断、フィルターろ過によるサイズ分離によりCNTの長さをそろえ、超音波照射処理等によりできるだけ分散した状態で、細胞機能性試験を行うと、上述のナノ微粒子一般と同様に1 μmや600nmよりも長さの短い200nmの方が炎症性サイトカインIL-1β、TNF-αの産生が低くなる結果が得られる¹²⁾。図1には長さが200nmのCNTの結果を示した。

(2) *in vivo*組織反応性

ラット体内埋入による組織反応性試験を行うと、1～0.5 μmよりも長さの短い200nmの方が、早く細胞内に貪食されてライソゾームに取り込まれ、起炎性が低いことが観察される¹³⁾。CNTの長さにより貪食されやすさや起炎性が影響を受ける特性は*in vitro*の結果と一致している。2年程度までの短中期的埋入試験ではCNTのサイズや結晶構造に依存して被包化や肉芽組織形成等、若干の差異はあるものの強い炎症や腫瘍形成等は認めない。

(3) 結晶構造依存性

またこうした細胞刺激性や起炎性は単層CNT、

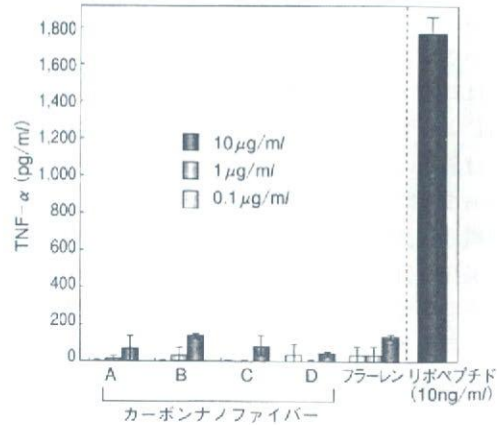


図2 微粒子と微生物
バイオイナートなCNTは細菌内毒素に比べ刺激性は微弱である¹⁾

多層CNT、CNF等の結晶構造にも依存性を示し、とくに円錐型グラフェンシートが長さ方向に積層した構造のCNFではグラフェンシート末端が表面に露出し官能基と反応し得ることや機械的に長さ方向に分断されやすい特性を持ち、起炎性が比較的低く生体に早く処理されやすい性質を示す¹⁴⁾。

6 生体反応性に及ぼす微粒子効果

図2はこうした物理的サイズ効果による刺激性の強さを評価するために、各種処理したCNFやフラレーンに対するTNF-α産生を細菌内毒素の一種リポペプチドと比較したものである。添加濃度に対する産生量を考慮に入れると、endotoxin等の細菌内毒素に比べれば、こうしたバイオアクティブ、バイオイナート材料の微粒子に起因する毒性は絶対値が1/1,000～1/10,000以下とはるかに小さい^{1, 7, 15)}。

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化学的效果が支配的であり、為害性は材料に依存する。μm～nmになると、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・イオン溶出効果のため、マクロでアレルギー性を示すNiが微粒子になると発癌性を示すように、比表面積効果により為害性は著しく強く

なる。一方、CNTも含め化学的特性による影響の小さいバイオアクティブ、バイオイナート材料では微粒子の物理的サイズ効果による刺激性が材質によらず顕現化するが、少量の場合、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* 組織埋入試験では組織内で局所的に貪食を誘発して炎症を引き起こし、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。こうした微粒子が体内に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いた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。

7 微粒子形状効果—アスベストとCNT

アスベストの発癌性はよく知られているが、材質自体は粘土鉱物のシリケートの一種であり、複合的な要因の第一に挙げられるのは針状結晶形態による物理的微粒子有害性効果である。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、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す。

図3はアスベスト（クロシドライト）とCNTを混合し水中攪拌後、乾燥させた状態でのSEM像

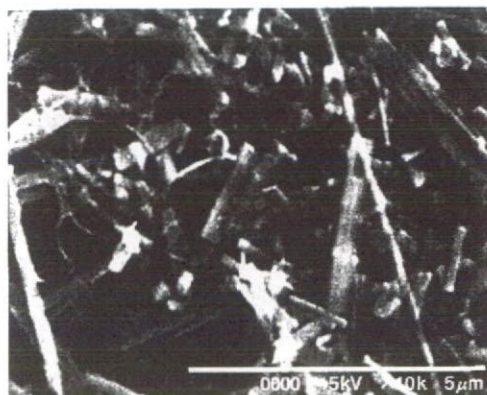


図3 アスベスト（クロシドライト）の分散性とCNTの凝集性³⁾

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。図は乾燥時に集積した部位で、針状のクロシドライトに細いCNTがからまるように凝集している。CNT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ほとんど湾曲することがないのに対し、CNTは屈曲性に富み、疎水性で凝集しやすいことが分かる³⁾。

このようにCNTはアスベストとはやや異なる形態・動態・挙動を示す。しかし数百nm以上の直径の大きいCNTや非カーボン性ナノチューブの一部では、屈曲性が乏しく微粒子形状の直線性が強くなり、アスベストに類似した形態も認められ、注意が必要である。

8 CNTのバイオ応用特性

筆者らはCNTの細胞機能性試験、動物埋入試験を行い、上述したバイオイナート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有害性は認めず、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CNTの開発^{7, 16, 17)}、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等のバイオ応用、有害汚染物質の吸着捕捉材¹⁸⁾等の環境対策への応用開発を進めてきている¹⁹⁾。

図4は人工体液中に浸漬後、CNT上に析出したア

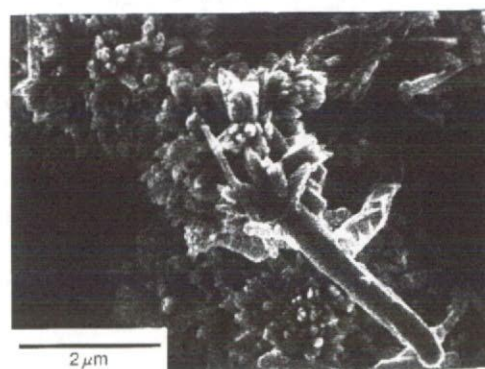


図4 人工体液中でCNT上に析出したアパタイト¹⁴⁾