

200839006A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成21(2009)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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成21(2009)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に関する研究 25
阿部 薫明 (北海道大学大学院歯学研究科 助教)
- B. 生体内に包埋されたナノ微粒子の高分解能電子顕微鏡観察に関する研究 45
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. ゾウリムシを毒性評価系とする銀微粒子の細胞毒性発現に関する研究 51
芳賀 信幸 (石巻専修大学理工学部 教授)
- D. ゾウリムシのX線顕微鏡による観察 -CT観察及び元素分析 56
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 61
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とBMPを用いた 69
異所性骨形成に関する研究
川浪 雅光 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
- G. **Maturation of osteoblast-like SaoS2 induced by carbon nanotubes** 74
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 85
(2) Imogoliteスキャホールドが細胞機能へ与える影響 88
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 91
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 96
金属製生体材料の生体適合性評価
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 100
水野 峰男 ((財)ファインセラミックス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-アルミナ生体複合材料の高機能化に関する研究 107
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)

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(3) 119
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— ... 129
横山 敦郎 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
3. バイオ微粒子により惹起される異物性炎症反応による 145
骨吸収の可視化評価モデルの開発に関する研究
遠山 晴一 (北海道大学病院 准教授)
4. チタン合金の腐食生成物とその生体為害性に関する研究 155
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. カーボンナノチューブによる芳香族揮発性有機化合物の 161
吸着機構に関する研究
古月 文志 (北海道大学大学院地球環境科学研究院 教授)
6. カーボンナノチューブが細胞に及ぼす影響に関する研究 172
戸塚 靖則 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
7. (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 178
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」(3): 185
「トンネル構造」の血管と骨の誘導効果と最適空間論について
北川 善政 (北海道大学大学院歯学研究科 教授)
8. ナノコンポジットの体内挙動検索に関する研究 192
—炭酸アパタイト・コラーゲン複合体の骨再生能に関する材料学的考察—
岡崎 正之 (広島大学医歯薬学総合研究科 教授)
9. ナノアパタイトの全身動態検索に関する研究 197
石川 邦夫 (九州大学大学院歯学研究院 教授)
10. 物質動的化学マッピング技術の開発 201
朝倉 清高 (北海道大学触媒化学研究センター 教授)
11. 生体観察を目指したTEMエンバイロメンタルセルの開発 207
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

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。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。食食等の生体反応を誘発する10 μ m以下や体内侵入し得る200nm以下の微粒子は工具による切削や人工関節骨頭摺動部から発生する摩耗粉に相当程度含まれる。こうしたナノ微粒子のリスクアセスメントやターゲット臓器に選択的に抗癌剤を移送するDDS(Drug Delivery System)の応用開発には体内動態の可視化が必須である。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、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(レーザー/マス、質量顕微鏡)法、③MRI法を開発/適用した。

(1)全身動態 ①XSAM法：マウスへ尾静脈注入、一部については経口投与後、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。体内拡散挙動の違いから、①肺→肝臓→脾臓と移行するTiO₂型、②投与直後から優先的に脾臓・肝臓に到達・滞留するPt型、③それらの中間の性格を有するITO型の3種のタイプに分類

できた。微粒子体内動態と毒性発現の関係については体重と臓器重量の変化でモニターした。液晶等日常生活で広汎大量に使われているITOでは投与後2週間程度で、30%近くの体重減少と2倍近くの脾臓(重量)の肥大化が認められた。毒性の可能性に対する検討と注意が必要である。

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ペクトルにかけ、2次元質量分布像を得た。投与24時間後、肝臓から検出され、脳、肺、脾臓からは検出されなかった。

③MRI法：マグネタイト(Fe_3O_4)やフェライト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・組織内表示 ④蛍光発光・光学顕微鏡法：NF κ B活性化で化学発光するトランスジェニックマウスを用い、頭頂骨上に人工関節カップ部から発生したポリエチレン摩耗粉を負荷し、炎症の発現とその部位・程度・経時変化をきたままバイオイメージングアナライザーで可視・定量化した。

(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ナノ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。またその詳細な形態を投影型X線顕微鏡で観察した。

(4)細胞内動態 ⑤透過型電顕・超高压電顕法：尾静脈注入CNTの体内動態・臓器捕捉、ラット軟組織内に埋入したCNT, CNFの細胞内取込、ライソゾーム内での漸次的な分散化やCNFの破折断片化等の代謝過程を超高压電顕高分解能観察とともに、エネルギーフィルター超高压電顕によるCの内殻励起エネルギー選別(C_k ELS)像を用い、ライソゾーム中のCNTの選択的イメージングを実現した。

ナノ物質に対する生体防御機構の作動は限定的であり、200nm以下のナノ粒子は比較的容易に体内侵入・全身拡散する。これはリスクであるとともに、薬剤投与には好都合である。ナノ物質はその存在自体が生体反応誘発性を有し(bioreactive)、高機能性(メリット)にも為害性(デメリット)にも働き得る。こうした二面性を有するナノ微粒子の体内動態の可視化はナノテクノロジーのリスクアセスメントとバイオ応用の展開に必須のデータであり研究手法である。

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
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 地球環境科学研究所	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と生体防御機構

ナノテクノロジー開発は人口減少する21世紀高齢社会において日本が工業・輸出立国と世界における高度先進立国を引続き維持し、高齢者の自立、QOL (Quality of Life)、若年者層への介護・福祉の負担軽減を実現するために必至である。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。しかしナノ物質は生体にとって未知の対象であり、生体防御機構が必ずしも十全に作動するわけではない。

A2. ナノ/マイクロ微粒子の生体反応性

—化学的比表面積効果と物理的サイズ効果—

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のような溶解性有害材料では短・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。

図1はナノテクノロジーの力学世界、生体との関係、および材料のマイクロ/ナノサイジングと生体反応性の関連を示したものである。

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(図1a)。

一方、生体親和性にすぐれるTiや粘土鉱物の1種アスベストでの有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、微粒子という物理的存在自体に由来する効果が寄与していると考えられる(図1b)。

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、マイクロ/ナノ、特に10 μm 以下ではこれに加え、金属・セラミックス・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食毒を誘発し炎症を引き起こす刺激性が顕在化する。

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。

A3. ナノ粒子の体内侵入と体内動態可視化法の開発 —微粒子動態可視化の4レベル

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。

一方、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、細胞に食毒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 μ m ~ 10mm 程度)臓器内表示
 - (3)微小領域(10 μ m ~ 1mm 程度)細胞動態
 - (4)超微小領域(1nm ~ 10 μ 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(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/マスマスペクトル・マッピング法に加え、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。

今年度はイメージング法としてさらに NF κ B 活性化で化学発光するトランスジェニックマウスとバイオイメージングアナライザーによる炎症発現部位と経時変化の可視化、単細胞個体(ゾウリムシ)の形態の投影型X線顕微鏡観察、エネルギーフィルター超高压電顕を用いたエネルギー選別(C κ ELS)像によるライソゾーム中のCNTの選択的イメージングを実施、実現した。

A4. 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。

②レーザー/マス法

(質量顕微鏡法 / MALDI-TOF-MS法) :

水溶性フラーレン(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、容易にフラーレン単体に乖離し、きわめて鋭いマスマ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50~100 μ m)。

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。

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。

④SEM-EDS(エネルギー分散型X線元素分析)法

軽元素までの分析が可能で、分解能は1 μ m、感度は0.1%程度である。電子顕微鏡下の観察であるため、真空内観察のための試料作製が必要である。

⑤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)

人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や

説明と同意（インフォームド・コンセント）等に関しては該当なし。

動物実験等に当っては、北海道大学大学院歯学研究科および医学研究科動物実験委員会のそれぞれ承認を得て、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成18年文部科学省告示第71号）及び「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年環境省告示第88号）等に基づき、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」（平成19年4月1日海大達第61号）の条項に従って実施する。

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
- ① XSAM 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)
 - ③ MRI 法
バイオイメージングアナライザー
- (2) 中領域(100 μ m ~ 10mm 程度)臓器内表示
- ⑤ 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
- ④ 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
- ⑥ 透過型電顕・超高压電顕法(分解能 1nm)
エネルギーフィルター電顕法(EELS)
- (5) その他分析・検出法
- 放射光高感度検出(XAFS)
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

C. 研究結果

C1. 微粒子サイズと生体防御機構

図2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炎症性サイトカイン TNF- α の産生を示したものである。微粒子サイズが 150 μ m から 0.5 μ m へ順次小さくなるにつれ、産生は徐々に増加するが、特に 10 μ m を切ると細胞には貪食、組織中では炎症を誘発し、産生(刺激性)が急激に増大する。

TNF- α 産生で示される刺激性は、 μ m 前後 ~ 0.5 μ m 付近でピークを示した後、200nm 付近以下になると、むしろ低下し 50nmTiO₂ ではマクロに近い低いレベルになる。

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が、生体防御機構がもはや十分に働かず異物の侵入を許すことにも通ずる。典型的には 50nm 以下のナノ粒子は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、免疫機構が十分に確立されておらず、体内への侵入が起こり得ることを示すものである。

このような現象は、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、bioactive, bioinert な特性を有する材料共通に認められ、材料に非特異的に起きる効果である。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のため、その為害性は著しく昂進し、異なる挙動を示した。

C2. 摩耗粉の粒度分布

図3, 4はそれぞれヒト歯牙、Ti を歯科用エアタービンで研磨したときの摩耗粉の粒度分布を示したもので、細胞・組織反応誘発性のある 10 μ m 以下、また体内侵入が可能な 200nm 以下の微粒子が相当程度含まれることがわかる。

図5, 6は本研究の主要目的である広領域全身分布可視化のための、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・マッピング法の原理を、図6は(2)中領域(100 μ m ~ 10mm 程度)臓器内表示のための、⑤蛍光・光学顕微鏡法用の蛍光ラベリング(coumarin 6)処理法を示したものである。

C3. 微粒子体内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ーXSAM(X線走査型分析顕微鏡)元素マッピング法:

④ TiO₂

TiO₂ ナノ微粒子は白色の色調付与や紫外線カット用に化粧品に一般的に使われ、また光触媒効果を利用して汚染しにくいセルフクリーニング機能のある表面コーティング材としても大量に使用されつつある。

①-1 尾静脈からの血流への直接注入

①-1.1 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。

図8は金属Ti, Fe, Pt微粒子投与1日後、摘出したマウス各臓器の元素マッピング像で、Tiでは肺に、Fe, Ptでは脾臓で高濃度に各元素が検出されている。

①-1.2 体内動態の微粒子材質依存性

図9は微粒子の臓器間移行を各臓器における相対的な存在比率として表示したもので、TiO₂とPtでその経時的变化の挙動が異なっている。

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。

⑤ Pt

Ptナノ粒子は機能性食品として最近コンビニエンスストアなどでも販売されているのを見かける。どのような効果と生体への影響が調べられているのか、筆者は特に調べていない。

図10はPt粒子を尾静脈注入1週後のマウス各部位での存在比率で、肝臓、脾臓、肺、腎臓の順に含有されているが、その総量は初期投与量の30~40%程度であり、排出された尿中には1日後にごくわずか検出されたのみである。その他の未検出分はさらに分析と検討が必要である。

①-1.3 XSAMマッピングの定量性ー化学分析による比較校正

摘出した臓器についてXSAM元素マッピング像取得を行った後、化学分析(ICP-AES)を行い、定量化およびXSAM法との比較校正を行った。また毒性発現の一つのモニターとして体重および臓器の重量変化に着目した。

図11はPt粒子をマウス尾静脈注入後の体重・脾臓重量(上)、各臓器におけるPt濃度(中)およびPt含有量(下)の経時的变化を示したものである。各臓器におけるPt濃度、含有量とも時間とともに概ね減少する傾向があるが、脾臓につい

ては変化はきわめて小さいままであった。体重は横這いまたは若干増加傾向にあり、脾臓重量はほぼ変化は見られなかった。これらは後述するITO粒子と比べ、互いに挙動が異なっている。

⑥ ITO

ITO(Indium Tin Oxide)は酸化インジウム(In₂O₃)に5%程度の酸化スズ(SnO₂)を添加した化合物で、透明であるため、液晶パネルや有機ELなどのFPD(フラット・パネル・ディスプレイ)、太陽電池、タッチパネル用電極材料として大量に使用されている。本研究では一般国民の生活レベルで大量に使用されて接触する頻度の高い材料であり、製造、廃棄、破壊等の事故等の過程における飛散、吸入、被曝、環境への流出の可能性が比較的高い材料であることから、今回検討材料の一つに含めた。

図12はITO粒子投与後のマウス各臓器のXSAMによるIn元素マッピング像で、aは投与直後、bは1日後である。コントラストの明るさから、肺から肝臓、脾臓への移行が見て取れる。

図13は肺からのXSAMエネルギー分散スペクトルのIn元素ピークの経時的变化を示したもので、時間とともに濃度が減少している。

図14はITO粒子投与1日後のマウス各部位におけるIn濃度を示したもので、低濃度部位は小枠内に縦軸に拡大して表示してある。肺、脾臓、肝臓での濃度が飛び抜けて高く、次いで腎臓、尻尾の順で濃度が高く、これに膀胱、心臓、脚部が次いでいる。

図15はITO粒子をマウス尾静脈注入後の体重・脾臓重量(上)、各臓器におけるPt濃度(中)およびPt含有量(下)の経時的变化を示したもので、図11のPt粒子の場合と比較対照的に示してある。各臓器におけるIn濃度および含有量は、肺では経時的に減少しているが、肝臓、脾臓では概ね横ばいかやや減少傾向にある。ただしPtの場合とは異なり、30%近くの体重減少と脾臓の視覚的にも重量測定においても2倍近くの肥大化が認められる。臓器疾患を伴う毒性と考えられる。

⑦各種微粒子の体内挙動による分類

図16は各種微粒子のマウス尾静脈注入1日後の肺、肝臓、脾臓の各臓器における相対的存在比率を示したものである。材料群は概ねTiO₂, TiC, Ti, Ni, Mnのように最初に肺で捕捉され、その後順次肝臓、脾臓へと移行するグループと、Pt, Wのように当初から脾臓に高濃度で検出される

グループに分けられる。ITO は挙動的にはその中間に位置すると見なすことができ、本研究ではそれらの代表的微粒子として Pt, TiO₂, ITO を重点的に取り上げた。

②レーザーアブレーション/マス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:

⑤フラーレン(C₆₀)

フラーレン誘導体にエネルギーを与えると、フラーレンと誘導体に解離することに注目し、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)法を開発した。今年度は空間分解能を向上させるためさらに、イオン化用にビーム径が小さく、かつ高周波の固体レーザーを採用した。

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

投与 24 時間後、肝臓で 720 m/z に C₆₀ に相当するピークが検出された。

図 17 は水溶化フラーレン静注 24 時間後の肝臓の結果で、マッピング像上段はフラーレン投与、下段はコントロールである。マスマスペクトル(右)から肝臓から、C₆₀ (M=C₆₀=12x60=720)付近にピークが認められ、およそ C₆₀ に対応する分子片の存在が検出同定された。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。脳、肺、脾臓では検出されなかった。脳には血液脳関門を通過するか否かの議論があるが、結論は今後さらに実験を積み重ねる必要がある。放射性物質等でラベリングせずにイメージング質量分析により臓器内可視化が可能となった。

③MRI 法:

⑥マグネタイト(Fe₃O₄)、フェライト

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した。MRI の適用には磁性ラベリングが必要であるが、今年度は平成 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 / 11nm)のほかに、磁性フェライトナノ微粒子(コバルトフェライト CoFe₂O₄/30nm, バリウムフェライト BaFe₁₂O₁₉/20nm, サマリウム鉄窒化物 Sm₂Fe₁₇N₂)を対象として行った。

図 18 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 時間後のマウスの MRI 像で、磁性粒子が濃縮するとコントラストは暗くなる。右下に見える鉛筆型の白色像は異なる像のコントラストを比較するためのスタンダードで、両者のコントラストの差異の比較から肝臓と脾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。こうした結果は XSAM 法で得られた体内動態の結果と一致している。

図 19 は変化をコントラストが暗くなる部位として捉えるのが必ずしも容易ではないので、画像処理により投与前、投与 1 週後の MRI 差画像を作り濃縮部位を明るくするようにした図で、投与前、投与後とその処理結果が示されている。腎臓への濃縮が確認できる。

図 20 は各種磁性粒子(マグネタイト、Ba フェライト、Co フェライト)をマウス尾静脈注入し体内循環を比較した MRI 像である。いずれも肝臓、腎臓、脾臓への濃縮を認め、概ね挙動は類似している。

(3)微小領域(10μm ~ 1mm 程度)細胞動態

④ SEM-EDS 法(分解能 1μm):

⑥マグネタイト(Fe₃O₄)

図 21 はマグネタイトナノ微粒子尾静脈注入 1 日後の XSAM 元素マッピングで、肺から肝臓への移行が進行しているのが見て取れる。

図 22 はその肝臓の SEM 観察像と EDS 元素分析(Fe, C, N)で、肝臓の中での Fe 微粒子の臓器内分布が確認される。図 21 の XSAM 法の分解能は 100μm であり、臓器内分布表示には図 22 のように異なる観察手段が必要である。

(2)中領域(100μm ~ 10mm 程度)臓器・組織内表示

⑤蛍光発光像(バイオイメーキングアナライザー法):

⑥ポリエチレン摩耗粉(PE)

人工関節摩耗粉に由来する骨吸収発現機序のシミュレーション実験として、炎症部位の NFκB 活性化で化学発光するように遺伝子組換えを行った NFκB/luciferase トランスジェニックマウスを用い、頭頂骨上に人工関節カップ部から発生するポリエチレン摩耗粉を負荷し、炎症の発現とその部位・程度・経時変化を生きのままバイオイメーキングアナライザーで可視化/定量化した。図 23 は負荷 7 日後で、負荷 5mg で頭頂骨上に化学発光量最大を示した。(後出 II.3. 遠山/小野寺ら)

(4)超微小領域(1nm ~ 10 μ m 程度)細胞内動態

⑥透過型電顕・超高压電顕法

①肝細胞内カーボンナノチューブ(CNT)

肝臓由来正常細胞(Hc)/癌細胞(HepG2)に CNT を添加すると、図 24 の TEM 像のように正常肝細胞は CNT を細胞質内に取込み、細胞核内には観察されず、細胞表面は多数の突起を有する鋸歯状を示した。

①静注体内動態 CNT、フラレノール(C₆₀(OH)₂₅)

表面をカルボン酸修飾した親水性 CNT では、投与 4 週後まで肺や肝臓への滞留が透過型電子顕微鏡(TEM)から観察された。脾臓でも検出されたが、滞留量は肺、肝臓に比べ少ない。腎臓では検出できなかった。球状化 CNT(CNT を造粒し球状 2 次微粒子としたもの)でも肺、肝臓に検出された。フラレノール(C₆₀(OH)₂₅)は球状凝集体をなし肺から検出された。

①軟組織内 CNT, CNF

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通常の透過電顕とともに、超高压電顕による高分解能観察ならびにエネルギーフィルター像観察を行った。

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。

図 25 は超高压電顕カーボンエネルギー選別(C_x ELS)像で、マクロファージ細胞内ライソゾーム中の MWCNT が繊維状の明るいコントラストで明瞭に認識できる。(後出 I.B.坂口ら)

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)

濃度・投与量(10 mg/mL, 0.6 mL)を一定にして尾静脈注入を行い、ナノ粒子の全身動態を XSAM 法を中心に可視化し経時変化と材質・粒度依存性を調べ、さらに ICP 化学分析と比較して定量評価を行った。糞・尿を採取し、体外排出も含め、投与物質総量の循環過程を検討した。白金・ITO については、尿では投与総量の 0.1%以下、糞では検出限界以下であり、その多くは体内に残留していると考えられ、肝臓では 20%程度検出された。表面をカルボン酸修飾した親水性 CNT では、投与 4 週後でも肺や肝臓への滞留が電顕から観察された。また MRI 造影法による生きたままの連続 3 次元観察も行った。

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/葦澤、佐藤)

フラーレン誘導体にエネルギーを与えると、フラーレンと誘導体に解離することに注目し、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、空間分解能を向上させるためさらに、イオン化用にビーム径が小さく、かつ高周波の固体レーザーを採用した。水溶化処理フラーレン C₆₀(OH)_n をラット尾静脈に注入後、各臓器(脳、肺、腎臓、肝臓)を摘出し、切片のマスマッピングを行った。投与 24 時間後、肝臓で 720 m/z に C₆₀ に相当するピークが検出された。脳、肺、脾臓では検出されなかった。放射性物質等でラベリングせずにイメージング質量分析により臓器内可視化が可能となった。

C(3) 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体内分布—(II.2. 横山/平田)

カーボンナノ物質の生体応用のために、生体反応の解明を目的として、皮下組織への埋入後の組織学的、超微細構造学的検索および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を用いた静注後の水溶化フラーレンの体内分布の解析を行った。ラットへの 1 年以上の長期埋入により、多層 CNT の外層の結晶構造に変化が生じることが明らかとなった。しかし 2 年間埋入後も、腫瘍などの変化は認められなかった。水溶化フラーレンは静注 1 時間後では、脳、肺、肝、腎、脾臓のいずれでも検出されず、24 時間後では肝臓で検出され、脳、肺、脾臓では検出されな

かった。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)

マスマッピング時に必要な質量分析の精度向上を図るため、ナノ粒子を用いた表面支援レーザー脱離イオン化法を検証し、形状異方性を有するナノ粒子は生体関連物質のイオン化に有効であることを見出した。さらに有機分子保護剤でコートせずに安定に水中分散できる金属ナノ粒子の調製を行った。

C2. 1. 2 単細胞個体(ゾウリムシ)の摂取行動・細胞内動態に及ぼす微粒子の影響

単細胞個体は *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) ゾウリムシを毒性評価系とする銀微粒子の細胞毒性発現に関する研究(I.C. 芳賀)

ゾウリムシを用いた細胞毒性評価系において、銀微粒子分散液は強い毒性を示し、毒性因子は銀イオンである。銀イオン曝露時、ウシ血清アルブミンでは、推定分子量 60 - 65 kDa の β チューブリンと新規遺伝子由来タンパク分子とのポリペプチドが特異的に出現し細胞毒性を中和する。これらは微小管系の崩壊等の毒性発現の初期過程に関連していると考えられる。

C(7) ゾウリムシの X 線顕微鏡による観察—CT 観察及び元素分析(I.D. 矢田)

ゾウリムシを投影型 X 線顕微鏡(分解能 0.1 μm)で観察し、光学顕微鏡及び SEM 像と比較した。自然乾燥した試料では扁平化しコントラストも劣る。臨界点乾燥や凍結乾燥をした試料では、形態が保存できた。CT 断層像で内部器官が観察できた。EDS 元素分析では Si, Os, P が検出され、Os は固定剤、P は核酸由来で残りは Si と判明した。Ag と Co-ferrite ナノ粒子の個体内部への取込の明確な証拠を得られなかった。

C2. 1. 3 細胞内動態の高分解能電顕観察

C(8) 生体内ナノ粒子のエネルギーフィルター高分解能電子顕微鏡観察(I.B. 坂口)

生物試料はコントラストがつきにくく、超高圧

電子顕微鏡ではさらに低下する。超高圧超高分解能電子顕微鏡付属電子エネルギー損失分光器(EELS)を用いたエネルギーフィルター像観察を試み、軟組織内の CNT を明瞭なコントラストで観察できた。また非弾性散乱電子像もプラズモンロス像のほか、C の内殻励起 ELS 像では個々の CNT を明瞭に区別することが可能となり、無染色観察の可能性が示された。

C2. 1. 4 組織内微粒子の放射光高感度検出

C(9) 組織内歯科・生体材料周囲微粒子の放射光高感度検出と状態分析(I.J. 宇尾)

インプラントやステントに用いられる Ni-Ti, SUS316L の擬似体内環境下における腐食生成物の放射光 XAFS(X 線吸収微細構造スペクトル)による高感度検出、状態分析を行った。生理食塩水中の水素チャージにより、Ni-Ti 中の Ti は TiOOH、Ni は NiOOH 様の微粒子を生成し、酸性条件下では Ni は沈殿物を形成せず溶出した。SUS316L では FeOOH を主成分とし腐食生成物量は相対的に少なかった。体内での Ni-Ti の水素脆性や Ni 腐食物・溶出イオンの為害性について検討が必要である。

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) チタン合金の腐食生成物と生体為害性(II.4. 淺岡)

口腔内、体内で用いられる Ti、Ti 合金は水素の関与する応力腐食にさらされる。加速試験で評価するために擬似体液下で Ni-Ti 合金の電気化学的応力腐食試験を行った。腐食生成物は、TiO₂ と Ni(OH)₂ の微粒子であり、マクロファージの貪食と TNF- α の産生、それに続く細胞死を誘導する。骨芽細胞に対しては細胞増殖を阻害しアポトーシスを誘導した。金属腐食の加速試験は、安全性評価のガイドラインの構築時の評価モデルとして有効である。

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、人工関節の使用壽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/橋本)

人工股関節の摩耗特性は、現在ライナーと骨頭

を潤滑液中に浸漬し、股関節シミュレーターにより評価される。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)ライナーと酸化ジルコニウム(ZrO_2)骨頭を用いて、昨年度の血清に引続き、本年度は血清以外の平衡塩溶液(BSS)、牛血清アルブミンおよびグロブリン等の成分比の異なる5種類の潤滑液中で実施し、摩耗量および摩耗粉の評価解析を行った。ライナーの摩耗量はタンパク質量の増加に伴い増大するが、摩耗粉の形状に関しては相関が認められなかった。

C(12) CNT-アルミナ生体複合材料の高機能化研究(I.L. 大森)

人工関節における潤滑性付与と摩耗粉抑制の対策として、耐摩耗性は高いが脆性のアルミナに種々のCNTを加え、放電プラズマ焼結(SPS)で複合材料を作製し特性を比較した。肉薄MWCNTは分散性が劣り、添加量とともに破壊強度と靱性が低下するが、肉厚MWCNTでは粒子分散性にすぐれ、市販のアルミナ製品よりも向上した。

C(13) バイオ微粒子により惹起される異物性炎症反応による骨吸収の可視化評価モデルの開発(II.3. 遠山/小野寺)

人工関節摩耗粉に由来する骨吸収発現メカニズムとして、カップ部から発生するポリエチレン摩耗粉により刺激された滑膜マクロファージがTNF- α やIL-1など骨吸収性サイトカインを放出し、破骨細胞の分化が促進されるサイトカインカスケードが提唱されており、その過程で転写調節因子NF κ Bは重要な役割を果たす。

NF κ B/luciferaseトランスジェニックマウスの頭頂骨上にポリエチレン摩耗粉を負荷し、NF κ B活性化で生じる化学発光をバイオイメージングアナライザーにより検出・定量化した。負荷7日目で発光量は最大を示し、ルシフェラーゼ活性および各種骨吸収性サイトカインのmRNA発現量と有意な正の相関を示した。生きたまま炎症反応を可視化できる点で本システムは、起炎性に及ぼす摩耗粉の材質や粒径、治療・予防効果への薬剤のスクリーニングに有用である。

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とBMPを用いた異所性骨形成(I.F. 川浪/天雲)-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/コンポジット薄膜による再生をめざしているが、本研究ではアパタイト/コラーゲン比を70/30、66/34、56/44に調整しrhBMP-2を含浸後、ラット背部皮下結合組織に移植し、新生骨形成を観察した。アパタイト含有量が高いほど硬組織形成に有利であった。

C(15) Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro(I.G. LI)

CNTスカフォールドの細胞分化へ及ぼす影響を調べるために、コールドプレスによりMWCNTとグラファイト(GP)のコンパクトを作製し、コントロール(Ctrl:通常の培養ディッシュ)とともに比較した。MWCNTは蛋白質吸着にすぐれ、マウス筋芽細胞(C2C12)の培養を行うと、細胞接着、増殖、分化ともGP、Ctrlに比べすぐれていた。また前処理としてあらかじめ50%FBSを含む培養液に浸漬した後、培養すると、MWCNTの4日後、7日後のTotal-protein/DNAとALP/DNAはそれぞれ、GPとCtrlの11倍、18倍に増大した。CNTのすぐれた蛋白質吸着特性のためと考えられる。

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」(3):「トンネル構造」の血管と骨の誘導効果と最適空間論について(II.8.(2)久保木/高山)

骨組織再生に最適な人工の細胞外マトリックス(ECM)の3次元幾何構造として、円柱状ハニカム構造の β -TCPを作製し、ラットの皮下に埋植し異所性骨形成実験を行った。BMP添加群では、ハニカムのトンネル内に、血管を取り囲むように成長した新生骨が形成され、非添加群では血管のみが新生した。この「トンネル効果」は骨、血管のみならず神経の再生にも有用であると期待される。

C(17) ナノコンポジットの体内挙動-炭酸アパタイト-コラーゲン複合体の骨再生能に関する材料学的考察-(II.9. 岡崎)

形態保持のため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る。骨増殖因子rhBMP2添加による骨再生促進効果を調べてきたが、骨再生能力の衰えた高齢者へ応用を考慮し

さらなる高機能化を試みた。家兎大腿骨埋入試験における新生骨面積率から、最適炭酸含有率は生体骨と類似した結晶性と含有量を有するスカフォールドで最も高い骨再生能を示し、血管新生因子SVVYGLRを修飾した場合、埋入1週目で血管新生が認められた。

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)

骨補填材として用いられる現状の焼結体アパタイトとナノアパタイトの生体内挙動の差異を検討した。水酸アパタイト焼結体上で破骨細胞を培養すると吸収窩は認められないが、炭酸アパタイトブロック上で培養すると破骨細胞による吸収窩が認められた。ラットの骨欠損部に埋入すると、いずれも優れた組織親和性と骨伝導性を示し周囲は骨に覆われたが、水酸アパタイト焼結体では吸収は全く認められず、ナノ結晶子炭酸アパタイトでは埋入4週後約50%に縮減した。ナノ結晶子炭酸アパタイトは焼結体水酸アパタイトとは全く異なる挙動を示し、骨欠損部埋入で破骨細胞によって吸収され骨に置換されるリモデリングを受け、骨置換性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) 細菌・細胞へのCNTの影響(I.E. 赤坂)

細菌(齲蝕原生菌 *S. mutans*)に対する沈降実験では、ナノサイズ効果および凝集能力により各種カーボン材料のうち30-MWNTsが最も沈降率が高かった(活性炭の約8倍)。また、細いナノチューブ(SWNT, 30-MWNTs)は細菌表面に彎曲しながら絡みつき捕捉する効果も観察された。経口投与による口腔内細菌や腸内細菌との相互作用が示唆された。

細胞培養への効果として、CNTコートは各種細胞の細胞増殖を促進させ(SWNTにおいてSaOs-2は1.2倍、HeLaは1.3倍)、その効果はMWNTsよりもSWNTsの方が高かった。

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/伊藤)

各種細胞へのCNTの影響を肝臓由来正常細胞(Hc)/癌細胞(HepG2)、ラット歯根膜由来細胞株を用い比較し調べた。CNT添加により肝細胞では細胞数の大きな変化はみられなかったが、ラット歯根膜細胞ではRNA量の増加、タンパク発現の低下が認められた。

C(21) スキャホールドに応用したImogoliteの骨芽細胞の機能性へ及ぼす影響(I.H.(2)八若/石川)

Imogoliteはアルミノシリケート系の白色ナノチューブ(外径2nm、内径1nm、長さ数 μm)であり、細胞増殖スカフォールドとして応用した。Imogolite上で細胞は良好に増殖し、細胞数・形態はSWCNTsとほぼ同等であり、culture dishと比較すると形態が多様で、分化に有利である。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) CNTによる芳香族揮発性有機化合物の吸着機構解析(II.6. 古月)

CNT充填カートリッジに、23種の揮発性有機化合物(VOCs)気体の吸着実験を行った。CNTは芳香族VOCsに対して選択性を示し、結晶度の増大と共に高くなった。フロンティア軌道理論から、HOMOとLUMOのエネルギー差が小さい芳香族VOCsのほうが、安定な反応中間体を形成し、CNTから π 電子を受け取りやすく、優先的に結合し吸着されると説明される。CNTの化学的な親和性や反応性を電子レベルで検討した研究は生体反応性にも示唆を与えるものである。

C(23) CNTが細胞に及ぼす影響—シリコンラバーへの細胞接着性付与(II.7. 戸塚/松岡)

CNTコートディッシュ上での細胞を培養すると増殖数はCulture dishとほぼ同等であり、継代培養を行っても形態・機能に異常は認められなかった。シリコンラバーは柔軟性や形成性に優れるが撥水性で生体親和性に劣るが、CNTをコートすると、接着細胞数が約10倍増加し、細胞付着・伸展性を著しく改善することができた。

C(24) コラーゲンを介したCNTコート細胞培養担体の開発と金属への応用(II.8.(1)北川/寺田)

チタン板をアミノ化後、アテロコラーゲンを付着させ、コラーゲンとの結合性を利用してMWCNTをコートした。コーティング層厚みは150-300nm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、良好な細胞増殖とトリプシンEDTAによる剥離も困難な高い細胞付着性を示した。これは高い比表面積とカルボキシル化による細胞接着因子の優先的な吸着と細胞の糸状仮足とMWCNTsの機械的結合によると考えられる。チタンインプラント等への応用の可能性が示唆される。

C2.5 その他の可視化手法の開発

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 はエネルギー選別分解能は高いが、電子強度が低下しやすい。実験室規模高輝度 X 線源の開発と 10-100 倍の高感度化により、X 線光電子放出顕微鏡 (EXPEEM) による元素分析像の取得が可能になった。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を可能とする X 線励起走査探針顕微鏡 (XANAM) の開発を行い、力場測定に成功し、放射光による原子間力場制御のメカニズム解明に道を開いた。

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

TEM 用密閉型加熱環境セルを開発し、反応性の高いアンモニアガス雰囲気中での LiH と NaH の水素化反応のその場観察を実現し、反応前後の変化を追跡した。

D. 考察

D1. 各種イメージング法の応用

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た。表 2 はそのリストである。

D2. 広領域(100mm 程度)全身動態イメージング

ー<主要開発3方法>

微粒子の臓器間移行を可視化する広領域(100mm 程度)全身動態イメージングとして下記の主要 3 方法:

- 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
- ③ MRI 法

を開発した。さらに臓器内、細胞内レベルの動態を明らかにするために、

- (1)広領域(100mm 程度)全身動態
 - (2)中領域(100 μ m ~ 10mm 程度)臓器内表示
 - (3)微小領域(10 μ m ~ 1mm 程度)細胞動態
 - (4)超微小領域(1nm ~ 10 μ 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、可視化を実現した。

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
エネルギーフィルター超高压電子顕微鏡 (1250kV)
加熱雰囲気エンバイロメンタルセル TEM
光学顕微鏡
蛍光顕微鏡
バイオイメージングアナライザー
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)

D3. 定量化

微粒子の体内動態の可視化とともに、定量評価を可能にするために、各臓器の XSAM マッピングと同一臓器の ICP-AES による化学分析を行い、定量化を進めた。①臓器内濃度、②臓器内総量、③体内残存率、部位別含有量等を算出した。

D4. 体内動態の3つのタイプ

体内動態の挙動の違いにより、おおよそ 3 つのタイプにわけられた。

① TiO₂ 型グループ

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。TiC, Ti, Ni, Mn, Fe₂O₃, Fe₃O₄ 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。

② Pt 型グループ

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。

③ ITO 型グループ

ITO は挙動的に TiO_2 と Pt の中間に位置すると見なすことができる。

微粒子によって TiO_2 等と Pt, Fe, W 等とは、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。

本研究ではこれら 3 タイプの代表的微粒子として Pt, TiO_2 , ITO を重点的に取り上げた。

ほかにフラーレン(C_{60})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。

D5. 微粒子体内動態と毒性発現

体内動態可視化と毒性発現の関連の研究はきわめて興味深く、かつ薬物体内動態とその薬効発現と表裏一体のテーマであり、実用的にも重要なテーマである。

本研究では水溶性ではじめから急性毒性を呈する物質は扱っておらず、多くはマクロで bioactive, bioinert 特性を示すが、微細化したときのナノトキシコロジーが問題になる Ti, Pt, Fe, TiO_2 , Fe_2O_3 , CNT, C_{60} (フラーレン)等の材料である。そのため為害性が発現する時間スケールはより長期(1 ヶ月～1 年程度)であり、体内動態試験の実験的時間スケール(投与直後～3 週間程度)とは必ずしも一致しない。例えば本研究で扱う中では為害性の最も強い Ni では軟組織埋入後 1 週間程度で周囲組織の壊死/炎症を起こすが、体内拡散以前にその場で為害性を呈し、さらに癌を発症するまでは半年～1 年程度の埋入期間を要する。

そこで毒性発現の一つの指標として、巨視的観察で認められた個体(体重)や臓器(大きさ、重量)の変化に注目した。取扱った試料の中で明らかに認め得る変化を示したものに ITO がある。図 15 に示したように、投与後 2 週間程度で、30% 近くの体重減少と 2 倍近くの脾臓(重量)の肥大化が認められた。急性ではないが、慢性よりもより急激な臓器疾患を伴う毒性と考えられる。

ITO は液晶等日常生活の中で広汎大量に使われている材料であり、特に工場での生産段階や廃棄物処理段階等、産業労働衛生の条件には注意が必要である。

D6 材料のサイズと生体反応性

図 1 はナノテクノロジーの力学世界、生体との

関係、および材料のマイクロ/ナノサイジングと生体反応性の関連を示したものである。比表面積増大による化学反応促進効果は材料特性のバルク(図 1a の上方)からマイクロ/ナノ(下方向)への延長であり、触媒のように同一機能が昂進する効果である。その発現は材料自体にのみ由来し生体とは無関係に生起する。溶出性材料における比表面積効果はきわめて顕著で、毒性の場合には急性で認識しやすい。

一方、そうした化学的溶出効果が無視し得る非溶出性材料や bioactive, bioinert 材料ではマクロでは問題にならないが、おおよそ $10\mu\text{m}$ 以下になると、材質によらず微粒子の物理的サイズ効果による刺激性が顕現化する。物理的サイズ・形状効果は微粒子と細胞・組織との相対的なサイズの大小関係に由来し、ナノサイジングが誘発する材料-生体間(図 1b の横方向)の相互作用であり (biointeractive)、これら生物学的プロセスを通して金属、セラミックス、ポリマーによらず材料に非特異的に発現する効果である。この効果により誘起された生体反応は状況に応じ、生体親和性から為害性へ、非骨置換性から骨置換性へ、細胞非接着性から細胞接着性へとマクロの物性から生物学的プロセスを通し機能性転換を生じるに至る。

ナノ微粒子は生体が防御機構の対象と想定してこなかった可能性があり、免疫システムが十分に作動せず、微粒子サイズが 200nm 以下、典型的には 50nm 以下になると、呼吸器系・消化器系を通して体内侵入・全身拡散を起こし得る。これは健康・環境の観点からはリスクであるが、逆に DDS のような薬剤投与の観点からは生体防御機構による拘束を回避し体内投与に活用できる点で好都合である。ナノ物質は人間の意図する目的と合致すれば高機能性というメリットとして作用するが (bioactive)、一方また意図せずして為害性というデメリットとして発現する可能性もある。マクロとは異なり、ナノマテリアルは本質的に生体反応誘発性を有する存在であり (bioactive)、高機能性と刺激性の二面性を併せ持ち、その制御が重要である。

D7 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ど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

1. ミクロ/ナノ微粒子のサイズが $10\mu\text{m}$ 以下では、細胞の貪食・組織の炎症の刺激性、さらにその延長として生体親和性から為害性へ、非骨置換性から骨置換性へとといった機能性転換をも時に導く生体反応誘発性を有する (**bioreactive**)。 200nm 以下になると刺激性はむしろ低下し免疫防御機構の働きには限度があり呼吸・消化器系を通して体内侵入・全身拡散が起こり得るようになる。
2. 工具による切削や人工関節骨頭摺動部から発生する摩耗粉の粒度分布には上述の $10\mu\text{m}$ 以下や 200nm 以下の微粒子が相当程度含まれる。
3. 微粒子の体内侵入・全身拡散の体内動態を巨視的・微視的に明らかにするために、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。
4. 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。
5. 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た。
6. 体内拡散挙動の違いから、微粒子材質の違いにより、①肺、肝臓、脾臓と移行する TiO_2

型、②投与直後から優先的に脾臓・肝臓に到達・滞留する Pt 型、③それらの中間の性格を有する ITO 型の3種のタイプに分類できた。

7. 微粒子体内動態における特定臓器への捕捉濃縮と毒性発現、薬剤の薬効発現の関係の研究は体内動態可視化の重要な応用であるが、本研究では急性毒性、短期的薬効発現の物質は取扱っておらず、巨視的な体重、臓器重量で効果を評価した。ITO では投与後2週間程度で、30%近くの体重減少と2倍近くの脾臓(重量)の肥大化が認められ毒性の可能性が考えられる。ITO は液晶等日常生活の中で広汎大量に使われており、注意が必要である。
8. ナノ粒子に対する生体防御機構の作動は限定的で、比較的容易に体内侵入・全身拡散する。これはリスクであるとともに、薬剤投与には好都合である。ナノ物質はその存在自体が生体反応誘発性を有し(**bioreactive**)、高機能性(メリット)にも為害性(デメリット)にも働き得る。
9. ミクロ/ナノ微粒子の体内動態の可視化はナノテクノロジーのリスクアセスメントとバイオ応用の展開に必須のデータであり研究手法である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (主任研究者関連のみ)

1. 論文発表

- 1)F.Watari, N.Takashi, A.Yokoyama, M.Uo, T.Akasaka, Y.Sato, S.Abe, Y.Totsuka, K.Tothji: Material nanosizing effect on living organism: non-specific, biointeractive, physical size effect, J.Roy.Soc.Interface, doi:10.1098/rsif.2008.0488.focus, 2009
- 2)巨理文夫: ナノマテリアルの生体反応 -リスクと活用-, ファルマシア 45 (3), 239-244, 2009
- 3)F.Watari, T.Akasaka, Xiaoming Li, M.Uo, A.Yokoyama: Proliferation of osteoblast cells on nanotubes, Front. Mater. Sci., DOI 10.1007/s11706-009-0034-z, 2009
- 4)F.Watari, S.Abe, I.D.Rosca, A.Yokoyama, M.Uo, T.AkAsaka, N.Takashi, Y.Totsuka, E.Hirata, M.Matsuoka, K.Kosuke, S.Itoh, Y.Yawaka: Visualization of invasion into the body and international diffusion of nanoparticles, Bioceramics Vol.21 Part 1, (Key Engineering Materials Vols.369-398, Trans.Tech.Publ., p.569-572, 2009

- 5)F.Watari, K.Tojji, K.Asaoka (Editors) : Abst.Int.Symp. on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes (ISNT2008), p.1-78, June 16-17, 2008, Sapporo, 2008
- 6)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
- 7)F.Watari, S.Inoue, N.Takashi, Y.Totsuka, A. Yokoyama: Reaction of cells and tissue to material nanosizing. *Trans.Mat.Res.Soc.Jap.* 33, 209-214, 2008
- 8)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, O.Okuno), Springer, Japan, p.139-147, 2008
- 9)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
- 10)N.Takashi, F.Watari, Y.Totsuka : Inflammatory Exudates Modulate the Function and Apoptosis of Neutrophils, *Oral Science International* 5 (2), 122-130, 2008
- 11)亘理 文夫 : ナノ粒子の生体反応性と為害性発現、*金属* 78 (9), 859-864, 2008
- 13)Michiko Terada, Shigeaki Abe, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshimasa Kitagawa and Fumio Watari: Multiwalled carbon nanotube coating on titanium, *Bio-Med.Mater.Eng.* in press
- 14)Yoshinori Kuboki, Michiko Terada, Yoshimasa Kitagawa, Shigeaki Abe, Motohiro Uo and Fumio Watari: Interaction of collagen triple-helix with carbon nanotubes: Geometric property of rod-like molecules, *Bio-Med.Mater.Eng.* in press
- 15)Tsukasa Akasaka, Atsuro Yokoyama, Makoto Matsuoka, Takeshi Hashimoto, Shigeaki Abe, Motohiro Uo and Fumio Watari: Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2) to carbon nanotube sheets, *Bio-Medical Materials and Engineering, BMME*, (2009) in press.
- 16)Tsukasa Akasaka, Keiko Nakata, Motohiro Uo and Fumio Watari: Modification of the dentin surface by using carbon nanotubes, *Bio-Medical Materials and Engineering, BMME*, (2009) in press.
- 17)M.Terada, S.Abe, T.Akasaka, M.Uo, Y.Kitagawa, F.Watari : Development of a multiwalled carbon nanotube coated collagen dish, *Dent.Mat.J.* 28(1), 82-88, 2009
- 18)T.Akasaka, F.Watari, Capture of bacteria by flexible carbon nanotubes, *Acta Biomaterialia* 5, 607-612, 2009
- 19)X.M.Li, H.Gao, M.Uo, Y.Sato, T.Akasaka, S.Abe, Q.L. Feng, F.Z.Cui, X.H.Liu, F.Watari : Maturation of osteoblast-like Saos2 induced by carbon nanotubes, *Biomedical Materials* 4, 15005-15012, 2009
- 20)X.M. Li, X. Liu, Y.X. Yu, X.H. Qu, Q.L. Feng, F.Z. Cui, F. Watari: Recent patents on polymeric scaffolds for tissue engineering, *Recent Patents on Biomedical Engineering* 2, 65-72, 2009
- 21)S.Abe, I.Kida, M.Esaki, T.Akasaka, M.Uo, Y.Sato, B.Jeyadevan, Y.Kuboki,M.Morita, K.Tojji, F.Watari: Biodistribution imaging of magnetic nanoparticles in mice compared with X-ray scanning analytical microscopy and magnetic resonance imaging, *Bio-Med.Mater.Eng.* in press
- 22)S.Abe, C.Koyama, T.Akasaka, M.Uo, K.Kuboki, F.Watari: Internal distribution of several inorganic microparticles in mice, *Bioceramics Vol.21 Part 1*, (Key Engineering Materials Vols.396-398, *Trans.Tech.Publ.*, p.539-542, 2009
- 23)S.Abe, C. Koyama, M.Esaki, T.Akasaka, M.Uo, K.Kuboki, F.Watari:Time-dependence and visualization of TiO2 and Pt particle biodistribution in mice, *J.Nanosci.Nanotechnol.*, in press
- 24)S.Abe, F.Watari, T.Takada, H.Tachikawa: A DFT and MD study on the interaction of coarbon nano-materials with metal ions, *Liquid.Crys.Mol.Crys.*, in press
- 25)Eri Hirata, Motohiro Uo, Hiroko Takita, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Atsuro Yokoyama: Development of a 3D collagen scaffold coated with multiwalled carbon nanotubes, *J Biomed Mater Res B.*, DOI: 10.1002/jbm.b.31327, 2009
- 26)F.Watari, T.Akasaka, M.Terada, M.Uo, K.Ishikawa, M.Matsuoka, Y.Kuboki, E.Hirata, A.Yokoyama, S.Itoh, Y.Yawaka, Y.Totsuka, Y.Kitagawa, S.Abe, M.Suzuki: Cell Culture on Nanotube Scaffolds for Implant Application, *Proc. 4th Max-Bergmann Symposium 2008*, C:39-40, 2008
- 27)亘理 文夫 : ナノマテリアルの生体反応とバイオ医用応用、*学術会議シンポジウム ナノマテリアルの未来と課題講演要旨集*, p.9-10, 2008
- 28)X.M.Li, CA. Van Blitterswijk, Q.L.Feng, F.Z.Cui, F.Watari :The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro. *Biomaterials* 29, 3306-3316, 2008
- 29)X.M.Li, H.Gao, M.Uo, Y.Sato, T.Akasaka, Q.Feng, F.Cui, M.H.Lui, F.Watari : Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro. *J Biomed Mater Res A*, DOI: 10.1002/jbm.a.32203, 2008
- 30)X.M.Li, X.M.Lui, W.Dong, Q.L.Feng, F.Z.Qui, M.Uo, T.Akasaka, F.Watari: In vitro evaluation of porous poly(L-lactic acid) scaffold reinforced by chitin fibers, *J. Biomed. Mater. Res.B*, doi:10.1002/jbm.b.31311), 2008
- 31)Uo M., Asakura K., Tamura K., Totsuka Y., Abe S., Akasaka T., and Watari F.: XAFS analysis of Ti and Ni dissolution from pure Ti, Ni-Ti alloy, and SUS304 in soft tissues, *Chem. Lett.*37, 958-959, 2008
- 32)Tsukasa Akasaka, and Fumio Watari: Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition, *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructure*, 16(2), 114-125, 2008
- 33)Wang, W., Yokoyama, A., Liao, S., Omori, M., Zhu, Y., Uo, M., Akasaka, T., Watari, F.: Preparation and Characteristics of a binderless carbon nanotube monolith and its biocompatibility. *Mat.Sci.Eng. C.* 28: 1082-1086, 2008
- 34)宇尾基弘 : X線による元素分析、*Journal of Dental Engineering* 167, 34-25, 2008
- 35)平田 恵理 : カーボンナノチューブコーとしたコラーゲンスポンジの3次元培養担体への応用, *Journal of Dental Engineering* 168, 32-33, 2008

2. 学会発表