

200839006B

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18～20年度 総合研究報告書

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18～20年度 総合研究報告書

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  
亘理 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 ..... 41  
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 ..... 81  
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. 単細胞個体ゾウリムシをバイオアッセイ系としたナノ粒子の ..... 88  
細胞毒性に関する研究  
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 - I, II ..... 94  
矢田 慶治 (株式会社東研 X線開発部 技術顧問)
- E. フラーレンマーカークの合成およびカーボンナノチューブのバイオ応用 ..... 101  
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 ..... 111  
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. **Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro** ..... 119  
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 ..... 128  
(2) Imogoliteスキャホールドが細胞機能へ与える影響 ..... 132  
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 ..... 135  
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 ..... 146  
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 ..... 152  
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とアルミナとから生体材料に適用可能な ..... 161  
複合材料開発に関する研究  
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ラット生体内の水溶化フラーレンの可視化に関する研究 ..... 173  
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— ... 194  
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骨吸収の可視化評価モデルの開発に関する研究 ..... 233  
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 ..... 247  
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の植物に対する反応性の評価に関する研究 ..... 258  
古月 文志 (北海道大学大学院地球環境科学研究院 教授)
6. ナノチューブ, ナノ微粒子, マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用に関する研究 ..... 262  
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細胞培養担体の開発に関する研究と金属への応用 ..... 270  
(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」の研究 ... 285  
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 ..... 304  
—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)
9. ナノアパタイトの全身動態検索に関する研究 ..... 311  
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 ..... 321  
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 ..... 330  
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

マイクロ/ナノ微粒子はそれ自体が非特異的に生体反応を誘発する存在であり (bioreactive)、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・消化器系を通じて体内侵入・全身拡散する。貪食等の生体反応を誘発する 10 $\mu$ 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・組織内、(3)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微粒子は、①肺→肝臓→脾臓と移行する TiO<sub>2</sub> 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種のタイプに分類された。微粒子体内動態と毒性発現の関連を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、毒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( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )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 $\kappa$ 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、炎症発現と部位・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)をバイオアッセイ系とし用い微粒子摂取行動・細胞内動態を連続観察し、Ag, CNT, 磁性ナノ粒子の細胞内動態・毒性評価、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、軟組織埋入CNT, CNFの細胞内取込、ライソゾーム内での分散・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によるCの内殻励起エネルギー選別( $\text{C}_k$  ELS)像を像出し、ライソゾーム中のCNTの選択的イメージングを実現した。

物理的微粒子サイズ効果が誘起する生物学的プロセス(**biointeractive**)を通して、ナノサイジングはTi人工関節摩耗粉やアスベストのような生体親和性から為害性へ、ナノアパタイトにおける非骨置換性から骨置換性へ、CNTの細胞非付着性から付着性への機能性転換を導き、そのプロセスは骨のリモデリングなど生命現象に本質的である。これを利用し、骨置換性ナノアパタイトコンポジットによる硬組織再生、細胞付着・伸展性ナノチューブの細胞培養スカフォールドの開発を行った。

人工関節摩耗シミュレーション試験・摩耗粉性状評価、マクロファージ遊走阻止因子ワクチンによる骨溶解抑制、CNTの毒性評価・揮発性有機化合物の選択吸着解析、光電子顕微鏡・TEM雰囲気セルの開発を行った。

イオン溶出性のFe, Niでは埋入期間とともに、炎症、壊死、腫瘍形成等、比表面積効果による強い為害性を示す。ITOも同様と考えられる。

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
森田 学	
北海道大学大学院歯学研究科	教授
(現 岡山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	教授
研究センター	
古月 文志	
北海道大学大学院	教授
地球環境科学研究院	
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	教授
サイエンス研究部	

## 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 $\mu$ m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性

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。

## A4. 体内動態可視化法の開発

### — 微粒子動態可視化の4レベル

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、細胞に貪食された微粒子の細胞内挙動を観察するには  $\mu\text{m}$  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 $\mu\text{m}$  ~ 10mm 程度)臓器内表示
  - (3) 微小領域(10 $\mu\text{m}$  ~ 1mm 程度)細胞動態
  - (4) 超微小領域(1nm ~ 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(表1)。

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 $\mu\text{m}$ )
    - 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 $\mu\text{m}$ )
    - ③ MRI 法
    - ④ バイオイメージングアナライザー
  - (2) 中領域(100 $\mu\text{m}$  ~ 10mm 程度)臓器内表示
    - ⑤ 蛍光・光学顕微鏡法(分解能 1 $\mu\text{m}$ )
  - (3) 微小領域(10 $\mu\text{m}$  ~ 1mm 程度)細胞動態
    - ④ 走査型電顕 SEM-EDS 法(分解能 1 $\mu\text{m}$ )、
    - ⑦ 投影型X線顕微鏡法(分解能 0.1 $\mu\text{m}$ )
  - (4) 超微小領域(1nm ~ 10 $\mu\text{m}$  程度)細胞内動態
    - ⑥ 透過型電顕・超高压電顕法(分解能 1nm)
    - ⑨ エネルギーフィルター電顕法(EELS)
  - (5) その他分析・検出法
    - ⑧ 放射光高感度検出(XAFS)
    - ⑧ 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

---

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。

イメージング法としてさらに種々の方法を開発または適用を試みたが、その中から光学顕微鏡、電子顕微鏡等の従来型の方法に加え新たに、⑦単細胞個体(ゾウリムシ)の形態の投影型X線顕微鏡観察、⑧NF $\kappa$ 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、⑨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 $\kappa$  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現、実施した。

## A5. 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一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

##### ① XSAM(X線走査型分析顕微鏡)元素マッピング法 (図2, 3)

Ti, Fe, Ni, Pt, TiO $_2$ , 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) (図 4)

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(図 3)、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(図 4、分解能約 50 ~ 100 $\mu\text{m}$ )。

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。

### ③ MRI 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 mm<sup>2</sup>, 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 SEM-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  $\mu\text{m}$ 、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 (図 5)

FITC や coumarin 6 で蛍光ラベリングした(図 5)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。

## C. 研究結果

### C1. 微粒子の生体反応性と体内動態

#### C1.1 摩耗粉の粒度分布

図 6, 7 はそれぞれヒト歯牙、Ti を歯科用エアービー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 $\mu\text{m}$  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。

#### C1.2 微粒子サイズと生体防御機構

##### C1.2.1 細胞反応に対するサイズ依存性 (in vitro)

図 8 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- $\alpha$  の産生を示したものである。微粒子サイズが 150 $\mu\text{m}$  から 0.5 $\mu\text{m}$  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 $\mu\text{m}$  を切ると細胞には食食、組織中では炎症を誘発し、産生(刺激性)が急激に増大する。刺激性は、 $\mu\text{m}$  前後 ~ 0.5 $\mu\text{m}$  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 50nm TiO<sub>2</sub> ではマクロに近い低いレベルになる。

このことは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じ、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。

図 9 は Ti(0.5 $\mu\text{m}$ )に対する細胞(ヒト好中球)の反応の SEM 像である。好中球が偽足を伸ばし食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 粒子の食食が確認される。食食は図 8 の TNF- $\alpha$  産生と密接に関連している。

##### C1.2.2 組織反応に対するサイズ依存性

###### (in vivo) - 長期埋入微粒子の組織内動態

各種金属微粒子のラット皮下軟組織への半年 ~ 1 年にわたる長期埋入試験(図 10)では、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イクロサイズと同様、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 $\mu\text{m}$  ~ 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が、周囲に取りこぼしがあり、炎症は長期間持続した。粒子群の凝集化は 10 $\mu\text{m}$  以下の微粒子で生起し、生物学的プロセスが関与しており、この時 *in vitro* の実験からは Ti のイオン溶出は無視できるレベルである。

### C1.3 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—XSAM(X 線走査型分析顕微鏡)元素マッピング法:

##### ① TiO<sub>2</sub> ほか

TiO<sub>2</sub> 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 呼吸器系

図 11 は化粧品に使われている 30nm の TiO<sub>2</sub> 粒子のラットへの強制露曝試験後の X 線走査型分析顕微鏡(XSAM)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。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であり、呼気によって肺胞に到達し、Bio-innert な物質でも炎症を惹起し、病理組織像や粒子の追跡から肺胞から血中への移行が認められ、さらに全身に拡散し、気管支、肺、肝臓、膀胱に 30nmTiO<sub>2</sub> 粒子が集積していることが見て取れる。

##### ①-2 消化器系

図 12 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。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 体内分布の経時的変化

図 13 は尾静脈注入後の体内動態で、X 線透過像と Ti マッピング像を示す。30nmTiO<sub>2</sub> 粒子は投与後数分では肺のみから、3 時間経過後では肺に加え肝臓から、1 日後肺からの信号が弱くなり、4 週経過時にはほぼ肝臓のみ、さらに脾臓へと移行している。

図 14 に Fe と Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の場合の結果(Fe 元素マッピング像)を示した。

##### ①-3.2 体内動態の微粒子材質依存性

図 15 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、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。TiO<sub>2</sub> と Pt でその経時的変化の挙動が異なっている。TiO<sub>2</sub> 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 16 は TiO<sub>2</sub> 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

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。

##### ② 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 17 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。

図 18 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 15b 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。

図 19 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。

図 20 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。

### ◎ ITO

ITO(Indium Tin Oxide)は酸化インジウム( $\text{In}_2\text{O}_3$ )に 5%程度の酸化スズ( $\text{SnO}_2$ )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 21 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 22 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 23 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 24 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 20 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。

### ①各種微粒子の体内挙動による分類

図 25 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  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiC}$ ,  $\text{Ti}$ ,  $\text{Ni}$ ,  $\text{Mn}$  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,  $\text{TiO}_2$ , 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フラレン( $\text{C}_{60}$ )

フラレン誘導体にエネルギーを与えると、フラレンと誘導体に解離することに注目し、フラ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。

炭素系ナノ微粒子の体内動態の可視化するためのレーザーマス・マッピング法のマーカーとして、細胞のレセプターや抗原に特異的に結合する糖鎖リガンドを共有結合させたフラレン誘導体を分子設計した(図 3)。ガラクトースまたはグルコースが 1~2 個結合した水溶性フラレン誘導体の合成が可能となった。

水溶性フラレン ( $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$ )、糖鎖化付加型水溶性フラレン (グルコース二量体  $\text{Glc}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$ 、ガラクトース二量体  $\text{Gal}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$ ) を注入し(図 3)、解離フラレンイオンの検出とその 2 次元分布像の描出を行った。

図 26 は水溶性フラレン投与 1 時間後のラット腎臓の  $\text{C}_{60}$  のレーザーマス・マッピング像(左)と腎臓内の 1 点からのマスマススペクトル(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、 $\text{C}_{60}$  ( $M=720$ )付近にピークが認められ、およそ  $\text{C}_{60}$  に対応する分子片の存在が検出された。

図 27 は水溶性フラレン投与 1 時間後のラット各臓器中の  $\text{C}_{60}$  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マススペクトルである。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、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( $Fe_3O_4$ )、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  $Fe_3O_4$  / 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  $CoFe_2O_4$ /30nm, バリウムフェライト  $BaFe_{12}O_{19}$ /20nm, サマリウム鉄窒化物  $Sm_2Fe_{17}N_3$ )を対象として行った。

図 28 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 29 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なるようにした図で、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 30 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(10 $\mu$ m ~ 1mm 程度)細胞動態

#### ④ SEM-EDS 法(分解能 1 $\mu$ m):

#### ⑥マグネタイト( $Fe_3O_4$ )

図 31 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 32 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 100 $\mu$ m であり、臓器内分布表示には図 32 のように異なる観察手段が必要である。

### (2)中領域(100 $\mu$ m ~ 10mm 程度)臓器・組織内表示

#### ⑤蛍光・光学顕微鏡法(分解能 1 $\mu$ m):

#### ⑥ポリ乳酸(PLA)

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 35 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なく、拡散、捕捉されているように思われる。

#### ⑧蛍光発光像(バイオイメージングアナライザー法):

#### ⑨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 NF $\kappa$ B 活性化で化学発光するように遺伝子組換えを行った NF $\kappa$ B/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ジングアナライザーで可視化/定量化した。図 33 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 $\mu$ 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 34 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( $C_{60}(OH)_{25}$ )

表面をカルボン酸修飾した親水性 CNT では、投与 4 週間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( $C_{60}(OH)_{25}$ )は球状凝集体をなし肺から検出された。

#### ⑧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。

図36に多層CNT(MWCNT)の結晶構造模式図(a)と超高压電子顕微鏡(HVEM)による長さ方向平行断面(b)および垂直断面(c)の高分解能原子像を示す。

CNTをラット皮下軟組織へ2年間までの長期埋入試験を行うと、肉芽組織に被包化され軽微な炎症が観察されるものの、組織変性、壊死などの強い炎症反応は惹起しなかった。TEM観察ではマクロファージに多く食食されライソゾーム内にも認められた。図37はラット軟組織に1週埋入後のマクロファージのライソゾーム内に取込まれた長さ220nmのCNTの100kV電顕像である。

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。

#### ⑨エネルギーフィルター電顕法(EELS)

図38は超高压電顕カーボンエネルギー選別( $C_k$  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)

カーボンナノファイバー(CNF)は炭素の六員環が2次元に配列したグラフェンシートが円錐状に長軸方向に積層した構造からなるCNTの派生体の1種である。図39はCNFの結晶構造(a)と、ラット軟組織に1年埋入後、マクロファージのライソゾーム中に取込まれ、破折断片化が進行中の長さ1200nmのCNF(b)の100kV電顕像である。CNFは長さ方向に断断されやすい結晶構造を有し、経時変化を観察すると、食食後、埋入期間とともにライソゾーム内での断断化と結晶性の低下が進行し、経時的にある種の生分解性

(biodegradation)が認められた。

図40,41は埋入1年後、細胞内ライソゾーム中の1200nm-CNFの結晶構造が乱れた破折断片部分の超高压電顕による高分解能原子像である。図41は約15原子層の厚みのわずかに結晶性が保たれている微細ナノ結晶破片である。

#### C1.4 CNTの細胞培養スカフォールドへの応用

CNTスカフォールド上に播種した骨芽細胞様細胞(Saos2)は培養増殖するとともに、通常、紡錘状に単一方向に伸張するのに対し、全方向に広く伸展した形態を示し、細胞末端では突起がCNT叢スカフォールド内部まで伸展、嵌入した(図42)。CNTと強固に結合するため、トリプシン処理でも剥離が困難(図43)であり、純炭素の同素体のうち、グラファイトがほとんど細胞付着性を示さないのに対し、CNTはすぐれた細胞付着・伸展性と蛋白質吸着能を示した。単層(SWCNT)と多層(MWCNT)を比較すると、SWCNTのほうがより高い細胞増殖、アルカリフォスファターゼ(ALP)酵素活性を示した。

図44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を強拡大したものが図44a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

##### C1.5.1 マクロサイズにおける機能性

アパタイトは通常(マクロサイズでは)、新生骨形成を誘導しすぐれた骨誘導性を示すものの材料自体は非吸収性で体内に恒久的に残留するから、構造材としてのインプラントに適しているが、それ自身は骨に置き換わることはない。

##### C1.5.2 ミクロ/ナノ効果(1)

しかし50nm以下のナノ微粒子になると生分解性に変化し、生物学的プロセス(図1b)を経て機能性転換を生じ新たな機能を発現する。

アパタイトが微細粉末になると、他のbioactive, bioinert材料と同様、物理的サイズ効果により、食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 45 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、上記の食食、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 46 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。5 $\mu$ 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。

### C1. 5. 4 ミクロ/ナノ効果(2)ー機能性転換

図 47 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した例で、8 週後の状況である。埋入直後、視野全体に存在していたコンポジットに、骨芽細胞と破骨細胞が出現し協働的に作用し、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し、結果としてナノアパタイトコンポジットが骨置換性としての機能性に働いている。アパタイトを一部炭酸化すると結晶性がさらに低下し、化学的な溶解性も増大することと相俟って骨置換がさらに容易に進行する。ここでは破骨細胞と骨芽細胞が現れ協働的に作用して、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。このような現象はミクロ/ナノ微粒子の生体反応誘発性(Bioreactive)とそれに伴い生ずる生物学的プロセス(図 1b)による機能性転換のメカニズムから理解することができる。

## 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)

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。また糞・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。XSAM - ICP の結果の相関を検討し XSAM による観察結果の定量的評価を試みた。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。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。

##### C(2) イメージング質量分析を用いたラット体内の水溶性フラレンの可視化(II.1. 田路/葦澤、佐藤)

フラレン誘導体にエネルギーを与えると、フラレンと誘導体に解離することに注目し、フラ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。水溶性処理フラレン  $C_{60}-(OH)_n$  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。

$C_{60}-(OH)_n$  を注入したラットの 1 時間後の肝臓切片の質量スペクトルから、720 m/z に  $C_{60}$  に相当する質量スペクトルを検出するものの、ノイズとの差が大きくないため、 $C_{60}-(OH)_n$  が肝臓内に存在すると断言できなかった。一方、24 時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトルから、 $C_{60}$  に相当するピークを検出し、また肝臓切片のすべての場所に  $C_{60}$  がイメージングされていることから、 $C_{60}-(OH)_n$  が満遍なく肝臓に存在することが明らかになった。

投与 24 時間後、肝臓で 720 m/z に  $C_{60}$  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。「フラレンによるドラッグデリバリーシステム」、さらには「ナノトキシコロジー分野」においても幅広く利用されていくものと期待



される。

### **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生体内分布—(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.1. 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。

### **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—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) 単細胞個体ゾウリムシをバイオアッセイ系としたナノ粒子の細胞毒性に関する研究(I.C. 芳賀)**

単細胞真核生物であるゾウリムシを用いた迅速

で再現性の高い高感度バイオアッセイ系の確立を目的として、各種ナノ粒子の細胞内取り込み、生存、細胞増殖、子孫の形成などを評価項目に設定して検討した。数十mg/mlという非常に高い分散液を除き、棒状カーボンナノ粒子、フェライト系磁性ナノ粒子、チタン系酸化物ナノ粒子はすべての評価項目において細胞毒性を示さなかった。しかしながら、銀ナノ粒子は数 $\mu\text{g/ml}$ という低い分散液でも数分以内に100%の細胞死を誘導する強い細胞毒性を示した。毒性は銀粒子分散液中で生成される銀イオンであること、およびウシとヒト血清アルブミンに中和作用があることを見出した。

### **C(7) ゾウリムシのX線顕微鏡による観察(I.D. 矢田)**

ゾウリムシを投影型X線顕微鏡(分解能0.1 $\mu\text{m}$ )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、形態が保存され、SEMで網目状体表面構造、繊毛等が観察され、X線像ではコントラストが向上した。オスミウム酸固定の場合特に、トリコシスト(毛胞)等の内部器官の存在と構造が認められた。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。

### **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CNTの高分解能およびエネルギーフィルター超高压電子顕微鏡観察(I.B. 坂口)**

生物試料はコントラストがつきにくく、超高压電子顕微鏡ではさらに低下する。コントラストが高い通常の低加速TEMによる組織内分布状況観察と超高压電顕による微細結晶構造観察を組合せ、生体組織内CNTの高分解能観察を実現した。低加速TEM観察から、ラット軟組織に埋入直後のCNTは数 $\mu\text{m}$ 大の凝集体をなすが、時間経過とともに凝集が徐々に解離し1年後には一部ライソゾームに取込まれること、超高压電顕高分解能観察からCNT最表層にはグラフェン構造シート層の剥離等の構造欠陥が形成され、細胞のライソゾーム内の弱い酸性環境下でナノチューブのある種の生分解(Biodegradation)が進行することを明らかにした。また超高压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、超高速



電圧下で軟組織内 CNT を明瞭なコントラストで観察できた。プラズモンロスのほか、C の内殻励起 ELS による非弾性散乱電子像で個々の 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と電顕構造解析

##### 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. A. 淺岡)

治療に有効に寄与するタンパクや薬剤を含浸可能なアパタイト被覆マイクロチタン粒子とチタン微粒子焼結体を作製した。

口腔内、体内で水素の関与する応力腐食に曝露される医用 Ti, Ti 合金の機能低下、遅れ破壊、発生した微粒子とその生体安全性評価について調べ、化学的環境、応力あるいはひずみに依存して機能低下することを定量的に示した。また腐食生成物の影響を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、TiO<sub>2</sub> と Ni(OH)<sub>2</sub> の微粒子であり、マクロファージの貪食と TNF- $\alpha$  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

人工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/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<sub>2</sub>)骨頭を用いて、摩耗に及ぼす蛋白質の影響を調べるために、牛血清、牛血清アルブミンおよびグロブリンを溶解した平衡塩溶液(BSS)、それらの成分比の異なる溶液等 5 種類の潤滑液中で摩耗試験を行い、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を全く含まない BSS ではほとんど摩耗せず、タンパク質量の増加とともに潤滑液中の成分に関わらず増大した。摩耗粉の形状に関しては相関が認められなかった。タンパク質は骨頭とライナーの界面に侵入し、ライナーおよび骨頭に凝着し、凝着タンパク質量が微量の場合には摩耗に対する保護膜として働くが、量が多くなると凝着摩耗を引き起こす。

##### 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。破壊強度と靱性は肉薄 MWCNT では分散性が劣り添加量とともに低下したが、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- $\alpha$  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 $\kappa$ B は重要な役割を果たす。NF $\kappa$ 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 $\kappa$ 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、起炎性に及ぼす摩擦粉の材質や粒径、治療・予防効果への薬剤のスクリーニングに有用である。

さらに TNF- $\alpha$  や IL-1 などの骨吸収性サイトカインを制御する最上流因子と目されるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) に対する自己抗体を産生させる目的で MIF-DNA ワクチンの開発を行い、磨耗微粒子で生じる骨吸収発生モデルへの応用が期待される。

### 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。その対策として再生を実現するためにナノアパタイト-コラーゲン/コンポジット薄膜を作製し、ラット背部皮下結合組織及び大腿筋内に移植し、硬組織の形成に及ぼす架橋剤 (EDC あるいはアスコルビン酸) および含有量の影響を調べた。架橋して作製した薄膜はともに BMP 担体として有効であり、アパタイト/コラーゲン比を 70/30、66/34、56/44 に調整した試料では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): ハニカム型トンネル構造 $\beta$ -TCP の血管・骨誘導と最適空間論 (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  $\beta$ -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。またアルカリフォスファターゼ活性で比較すると、最適ポアサイズは不規則な貫通孔を有する HAP の場合 300-400 $\mu$ m であるが、直線的トンネルを持つ  $\beta$ TCP では 75 $\mu$ m であった。最適の骨形成空間が、材質に依存すると同時に、トンネルの形状 (直線トンネルか、不規則なポアか) にも依存することを示している。

#### C(17) ナノコンポジットの体内挙動検索に関する研究 - 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 $\mu$ 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 の修飾によりラット頭蓋骨骨膜下埋入時の必要十分量の新生骨形成は 8 週から 4 週に短縮され、骨再生促進効果を確認した。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、最適炭酸含有率は家兎大腿骨埋入試験における新生骨面積率から、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。

まず水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露することにより、262-306 nm と極めて微細な結晶子からなるナノ炭酸カルシウムブロックを調製した。これを 1 モル濃度リン酸アンモニウム水溶液中 60 $^{\circ}$ C、14 日間浸漬しブロック形態を保持したまま炭酸アパタイトに変換し、間接引張強さ約 10MPa、炭酸基含有量 7.8% の炭酸アパタイトブロックが得た。

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、炭酸アパタイトプロ



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) フラーレンマーカ-の合成およびCNTの細菌捕捉・細胞培養への応用(I.E. 赤坂)

レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用フル-レンマーカ-として、糖鎖リガンドをフル-レン(C60)に共有結合し、細胞が有するレセプターや抗原に対する親和性を持ったフル-レン誘導体を分子設計し、ガラクトースまたはグルコースが結合したフル-レン誘導体および水酸基の導入率(20~35個)が高く水溶性を示すフル-レン誘導体を収率よく合成することができた。

細菌(齧蝕原生菌 *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。

CNTスカフォールド上で各種細胞を培養すると、細胞増殖が促進した(骨芽細胞様細胞Saos2の場合、SWNTでは1.2倍、HeLaは1.3倍)。また増殖はSWCNTのほうがMWCNTより促進効果が高く、特に毒性の影響が強く現れる低血清培地においてはSWCNTで顕著な増殖促進効果(3.3倍)が認められた。細胞培養増殖促進効果は再生医療分野でのCNTの細胞培養用スキャホールドとしての可能性を示唆するものである。

### 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の骨芽細胞機能性へ及ぼす影響(I.H.(2)八若/石川)

Imogoliteは自己組織化能を有する粘土鉱物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 $\mu\text{m}$ )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の植物に対する反応性の評価および芳香族揮発性有機化合物の吸着機構解析(II.6.古月)

イネ培養細胞OS-1細胞(*Oryza sativa L.*)、タバコ培養細胞BY-2(*Nicotina tabacum L. cv. Bright Yellow 2*)およびシロイヌナズナ培養細胞T8細胞を用い、CNTを含む数種類のナノ素材の毒性評価を検討し、ナノ材料の化学成分、物理状態および「有効添加量」等のパラメーターと深く関連することを明らかにした。

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 $\pi$ 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-シリコーンラバーへの細胞接着性付与(II.7.戸塚/松岡)

CNTの細胞に及ぼす影響を評価し応用を試みた。CNTコートディッシュ上での細胞増殖数は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。シリコー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シリコーンラバーに対して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(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)

CNT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 $\mu$ mの焦点径および解像度が得られ、さらに1~5 $\mu$ 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。さらに簡易型LEEM装置であるSLEEMの開発も行った。

### 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

各種ガス雰囲気内200 $^{\circ}$ Cまで加熱可能なTEM用密閉型加熱環境セルを開発し、水素、アンモニアガス雰囲気中でのMg, 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。ガス導入前後での粒子の膨張、電子線回折による反応生成物の確認、膨張量のガス圧依存性を調べ、化学反応速度論の観点から反応を解析できることを示した。

## D. 考察

### D1. 体内動態イメージング法の開発

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。

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電界放射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)

---

### D1.1 広領域(100mm程度)全身動態イメージングー<主要開発3方法>

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
- ③MRI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