

图 10-10

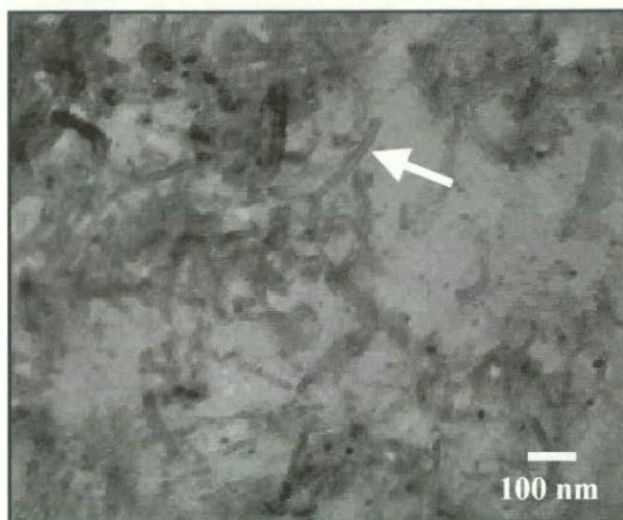


图 10-11

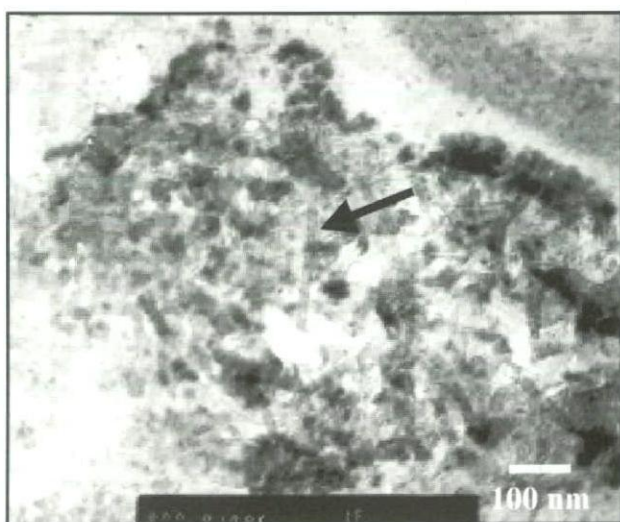


图 10-12

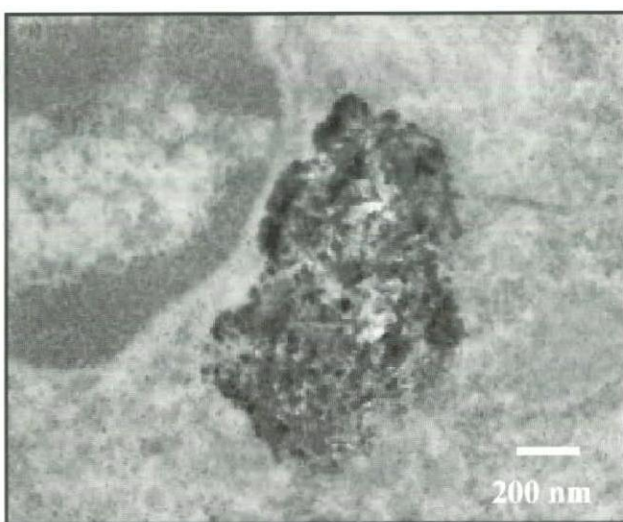


图 10-13

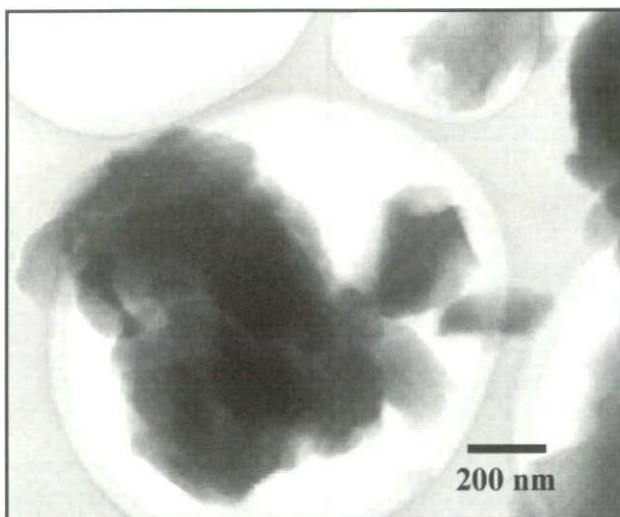


图 10-14

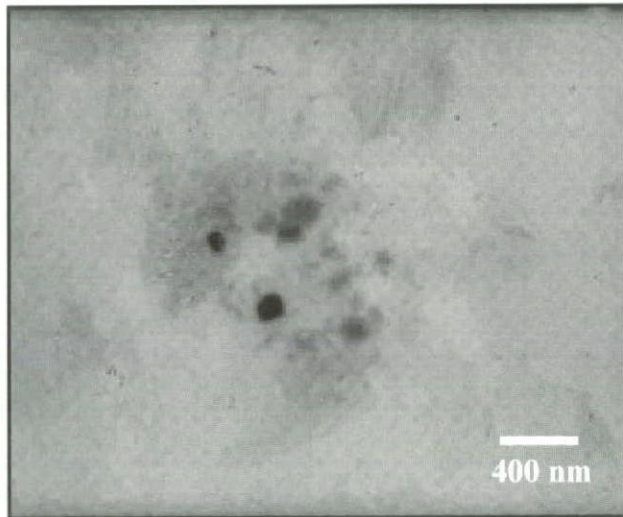


图 10-15

付図説明

図1-1

歯牙、及び歯科材料切削片のSEM像、a) 金パラ/DP、b) 金パラ/WC、c) 歯牙/DP、d) (c)の強拡大像

図1-2

歯科材料切削片（金パラ/DP）の粒度分布測定結果

図1-3

歯牙切削片（歯牙/DP）の粒度分布測定結果

図2-1

マイクロ粒子(TiO_2)暴露下での魚類（メダカ）の生存率

図2-2

マイクロ粒子(Ni)を暴露した魚類（コアカ）切片のXSAM像

- a) X線透過像、b) 蛍光X線スペクトル、c) (a)の強拡大像、
- d) (c)の走査範囲の蛍光X線(Ni)マッピング像

図2-3

マイクロ粒子(TiO_2)を暴露した魚類（コアカ）切片のSEM-EDS像

- a) 光学画像、b) SEM像、c) (b)の走査範囲の蛍光X線(C)マッピング像、
- d) 同蛍光X線(Ti)マッピング像

図3-1

TiO_2 、Pt 給餌用の寒天ブロック

図3-2

TiO_2 給餌（50 mg/day、一週間）マウスの肺の蛍光X線スペクトル

図3-3

TiO_2 給餌（50 mg/day、一週間）マウスの肝臓の蛍光X線スペクトル

図3-4

TiO_2 給餌（50 mg/day、一週間）マウスの脾臓の蛍光X線スペクトル

図4-1

TiO_2 投与（尾静脈注射）3時間後のマウス肺・肝臓のXSAM像、蛍光X線分析結果

- a) 光学写真、b) XSAM像、c) 蛍光X線スペクトル（肺）、d) 蛍光X線スペクトル（肝臓）

図4-2

XSAMによるマウス全身の体内分布観察結果(Fe_3O_4 、投与後1日)

図4-3

XSAMによるマウス全身の体内分布観察結果(TiO_2)

- a) 投与直後、b) 1日、c) 1週間後

図4-4

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4-5

XSAMによる TiO_2 投与マウス（一週間後）の連続切片の観察結果

図4-6

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4-6A：摘出臓器のマッピング像、図4-6B：各臓器の蛍光X線分析結果、

図4-6C：target元素の積分値算出、図4-6D：相対値算出

図4-7

XSAMによる様々な無機粒子の体内分布の観測結果(投与後1日) 図4-8

XSAMによる Fe_3O_4 粒子の体内分布の経時変化の観察結果

図4-9

XSAM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4-9A:Pt($\phi=1\ \mu\text{m}$)、図4-9A:TiO₂($\phi=1\ \mu\text{m}$)、図4-9C:Fe₂O₃($\phi=0.5\ \mu\text{m}$)、

図4-9D:TiO₂($\phi=0.5\ \mu\text{m}$)

図4-10

TiO₂粒子投与後1日のマウス肝臓のSEN-EDS観察結果

左上:SEM像、左下:炭素(C)マッピング像、右上:チタン(Ti)マッピング像、右下:窒素(N)マッピング像

図4-11

Fe₃O₄粒子投与後1日のマウス肝臓のSEN-EDS観察結果

左上:SEM像、左下:炭素(C)マッピング像、右上:鉄(Fe)マッピング像、右下:窒素(N)マッピング像

図5-1

Pt投与マウスの臓器内濃度の経時変化(肺・肝臓・脾臓)

図5-2

Pt投与マウスの臓器内重量の経時変化(肺・肝臓・脾臓)

図5-3

ITO投与マウスの臓器内濃度の経時変化(肺・肝臓・脾臓)

図5-4

Pt投与マウスの臓器内濃度の経時変化

図5-5

Pt投与マウスの臓器内重量の経時変化

図5-6

Pt投与マウスから採取した尿の重量

図5-7

Pt投与マウスから採取した糞の重量

図5-8

Pt投与マウスから採取した尿中のPt濃度

図5-9

Pt投与マウスから採取した尿中のPt重量

図5-10

Pt投与マウスから採取した糞中の含有元素分析結果

図5-11

Pt投与マウスの体内分布状況の模式図(投与後1週間)

図6-1

肺への単回強制暴露(Pt: 1-2 mg)後の各臓器のICP分析結果(上:投与直後、下:投与後1週間)

図7-1

XSAMおよびICPによるPt粒子の体内分布の経時変化の観察結果(a) XSAM、(b)ICPによる結果)

図7-2

XSAM-ICP 測定結果の相関図

左上段：Pt 元素からの蛍光 X 線信号の積分強度(XSAM_Intensity) vs ICP から得られた Pt 重量(Pt_weight)

左中段：蛍光 X 線信号の積分強度 XSAM_Intensity vs ICP から得られた Pt 臓器内濃度(Pt_concentration)

左下段：蛍光 X 線信号の積分強度 XSAM_Intensity vs ICP から得られた Pt 臓器内濃度の相対比(Pt_ratio)

右上段：蛍光 X 線信号の積分強度から算出した相対比(XSAM_ratio) vs Pt 重量(Pt_weight)

右中段：積分強度から算出した相対比(XSAM_ratio) vs Pt 臓器内濃度(Pt_concentration)

右下段：積分強度から算出した相対比(XSAM_ratio) vs Pt 臓器内濃度の相対比(Pt_ratio)

図8-1

様々な濃度でナノマグネタイト(Fe_3O_4)粒子を分散させた寒天(左)と、そのMRI撮像結果

図8-2

Fe_3O_4 粒子のMRI造影効果の評価(緩和時間-相対強度曲線)

図8-3 Fe_3O_4 粒子投与前後でのMRI撮像結果

図8-4

Fe_3O_4 粒子投与後のMRIの経時的変化図8-5

Ba-ferrite 粒子投与後のMRIの経時的変化

図8-6

様々な磁性粒子投与によるMRIの経時的変化

図9-1

蛍光色素(coumarin 6)をドープしたポリ乳酸粒子(m-PLA)のキャラクタリゼーション

図9-1A：m-PLA および coumarin 6 のUV-vis. 吸収スペクトル、

図9-1B：m-PLA の蛍光・蛍光励起スペクトル、

図9-1C：coumarin 6 の吸光度より m-PLA 中の色素濃度の評価、図9-1D：m-PLA のSEM像図9-2

m-PLA 投与後の各臓器への分布状況(蛍光顕微鏡により観察)

図9-2A：コントロール(脾臓)、図9-2B：m-PLA 投与後一週間(脾臓)、図9-2C：(肺)、

図9-2D：(肝臓)、図9-2E：低濃度 m-PLA 投与後1日(肺)、図9-2F：同(脾臓)

図10-1

CNT-COOH の反応スキーム

図10-2

CNT と CNT-COOH との分散性の比較

図10-3

フラレノール $\text{C}_{60}(\text{OH})_{25}$ の化学構造

図10-4

CNT-COOH 投与後の各臓器への分布状況(一週間後、倍率20倍)

図10-4A：コントロール(肺)、図10-4B：投与(肺)、

図10-4C：コントロール(肝臓)、図10-4D：投与(肝臓)

図10-5

CNT-COOH 投与マウス(一週間後)の肺のTEM像

図10-6

CNT-COOH 投与マウス（一週間後）の肝臓のTEM像

図10-7

CNT-COOH 投与マウス（一週間後）の脾臓のTEM像

図10-8

CNT-COOH 投与マウス（四週間後）の肺のTEM像

図10-9

CNT-COOH 投与マウス（四週間後）の肝臓のTEM像

図10-10

sph-CNT（乾燥粉末）のTEM像

図10-11

sph-CNT 投与マウス（投与直後）の肺のTEM像

図10-12

sph-CNT 投与マウス（一日後）の肝臓のTEM像

図10-13

sph-CNT 投与マウス（一日後）の肝臓のTEM像

図10-14

$C_{60}(OH)_{25}$ （乾燥粉末）のTEM像

図10-15

$C_{60}(OH)_{25}$ 投与マウス（投与直後）の肺のTEM像

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

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	市野瀬英喜	理化学研究所フロンティア研究システム 副ディレクター
研究協力者	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

研究要旨 本研究においては、カーボンナノチューブのバイオ応用を見据え、ラット皮下にカーボンナノチューブを包埋し、一定期間経過後に取り出した生体組織片を観察対象とし、生体内におけるカーボンナノチューブの原子構造解析に向けた高分解能電子顕微鏡観察技法の最適化について検討した。はじめに、低加速透過型電子顕微鏡を用いることにより、注入したカーボンナノチューブの生体組織内における分散状況を調べた。さらに、超高压超高分解能電子顕微鏡を用いた高分解能 TEM 観察を併用することにより、生体内に取り込まれたカーボンナノチューブの原子構造についても検討した。生体内に包埋された直後のカーボンナノチューブは、大きさ数 μm 程度の凝集体として存在しているが、包埋期間の経過とともに部分的に凝集がほどけていき、1年経過後には一部がライソゾームに取り込まれていることが低加速 TEM 観察により示された。さらに、高分解能 TEM 観察からは、長期間生体内に包埋されたナノチューブの最表面には多数の構造的欠陥が存在し、部分的にグラフェン層の剥離が生じていることが明らかとなった。これは、生体内においてカーボンナノチューブの分断化が進行していること意味しており、細胞内のような比較的弱い酸化環境下においてもナノチューブの分解が生じることが示唆された。

A. 研究目的

近年の急速なナノテクノロジーの進展は新たなリスクを生み出している。ナノマテリアルによって生じうる環境や健康への影響は既に現実的な問題になっているにもかかわらず、その潜在的なリスクについてさえ十分に議論されているとは言い難い。一方で、ナノテクノロジーを駆使したナノマテリアルやそれらを応用したナノエレクトロデバイスの開発は今後の日本国の浮沈を懸けて取り組むべき最重要課題であることは疑う余地も無く、世界をリードするための開発競争は熾烈を極めつつある。そのような

理由から、ナノマテリアルが使用された製品が市販されるようになった現在においても、健康へのリスクについては十分に把握できていないのが現状である。

他方、ドラッグデリバリーシステム（DDS: Drug Delivery System）をはじめとするバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合は、すでにそれなりの期間研究が継続されている。例えば、ナノパーティクルの中には、既に製品化され使用されているものがある一方、その応用にあたって安全性については手が回りかねているのが実状である。無論、バイオ

ナノテクノロジーを駆使した研究開発を増進させることと、安全性や健康へのリスクマネージメントを両立させることが必要であることは言うまでも無い。ナノマテリアルテクノロジーの分野では、原子構造、電子構造、物性、を一体のものとして捉えることによって、二つの作業のいわば一体化に関する試みが既に行われつつあるが、バイオナノテクノロジーにおいても、対象を限定すればおそらくこのことは可能である。特に、生体とバイオマテリアルとが近接しないしは接触した状態を生体とバイオマテリアル間の異相界面問題としてとらえれば、界面における原子構造、電子構造、物性、の三者相関の問題に還元することが出来るはずである。原子構造・電子構造・物性相関については、生体のみの系では原子配置の複雑さといったありようがマテリアル系とはかなりかけ離れている。純粋な生体系に比べれば、上述の界面問題に系を帰着させれば、前途はかなりの見通しがきくことになる。このような手法を生かせば、①ナノマテリアルの生体反応性に関する学術的・科学的データの整備、ナノテクノロジーのメリットとデメリットの両面からの総合的把握検討、②生体／ナノマテリアル界面に於ける物質移動と反応性の評価並びに安全性基準の提起、③これに立脚したナノバイオマテリアルの開発、などは十分に守備範囲となる。

そこで本研究では、カーボンナノチューブやナノファイバーなどの炭素系ナノ微粒子に興味の対象を絞り込み、生体とナノマテリアル反応の機構の共通項目と個別項目とに分けて原子・電子論的に解明し、ナノマテリアルのバイオ医用応用に求められる一定の指針得ることを目的とした。具体的には、一定期間生体内に包埋されたカーボンナノチューブの凝集状態を TEM 観察により評価するとともに、包埋期間の経過の伴うカーボンナノチューブの原子構造変化を高分解能 TEM により明らかにすることを試みた。合わせて、生体内に分布したナノ微粒子の TEM 観察技法に関する検討も行った。

B. 研究方法

ラット皮下にナノ微粒子(カーボンナノチューブ、カーボンナノファイバー)を包埋し、一定期間経過後に生体組織片を取り出した(還流固定、オスミウ

ム・酢酸鉛二重染色)。生体組織片を脱水、浸透後にエポキシ樹脂へ包埋・重合した後、マイクロームにより厚さ80nm以下に薄片化することでTEM観察用試料を作製した。生体組織片の高分解能 TEM 観察に先立ち、低加速電子顕微鏡(日立 H-700、加速電圧75kV)を用いて細胞内におけるナノ微粒子の凝集形態を TEM 観察した。その後、超高圧超高分解能電子顕微鏡(日本電子 JEM-ARM-1300、加速電圧1250kV、点分解能0.12nm)を用いて、生体組織片内に包埋されたナノ微粒子の高分解能 TEM 観察を実施した。なお、TEM 観察は室温にて行い、記録媒体には通常の TEM 用ネガフィルムを用いた。

C. 研究結果

ラット皮下にカーボンナノチューブを一週間、一年間包埋後のそれぞれの生体組織片の低加速 TEM 像を図 1-1 ならびに図 1-2 に示す。暗コントラストで示される大きさ数ミクロンのカーボンナノチューブの凝集体は細胞セル間に存在していた。これら凝集体の大まかな構造に違いは見られないが、一年間包埋した試料では、ナノチューブの凝集が幾分ほどけているように見受けられる。また両試料とも、個々の細胞組織は明瞭に観察されていることより、ナノチューブによる炎症反応は非常に弱いと考えられる。さらに、拡大した TEM 像を図 2 に示す。一週間包埋後試料の観察結果(図 2-1)より、幾つかのカーボンナノチューブが凝集体から分離されていることが分かる。さらに一年間包埋後試料の観察結果(図 2-2)からは、分離したナノチューブが貪食細胞に取り込まれている様子が観察された。特に、ライソソームに取り込まれたカーボンナノチューブの平均長は一週間包埋後のそれと比較して短くなっており、ナノチューブの分断化が生じていることが示唆された。

さらに、生体内に取り込まれたカーボンナノチューブの原子構造を詳細に観察するため、超高圧 TEM を用いた高分解能 TEM 観察を実施した。図 3 には、カーボンナノチューブ凝集体の明視野像(図 3-1)と高分解能 TEM 像(図 3-2)を示した。加速電圧の上昇に伴い、明視野像ではナノチューブのコントラストが不明瞭になるが、高分解能 TEM 像では、個々のナノチューブの形態とグラフェン層の積層が明瞭

に見てとれる。通常、ナノチューブの周囲に存在する生体組織は電子線の散乱を引き起こすため、高分解能TEM観察の際は像質の低下を招くこととなる。しかしながら、超高压TEMの優れた透過能により、カーボンナノチューブの原子構造や結晶性を議論するのに十分な分解能を得ることが可能であった。少なくとも一週間の包埋ではカーボンナノチューブの構造に乱れはなく、生体内で安定に存在していたと考えられる。一方、図4に示した一年間包埋後のカーボンナノチューブでは、個々のナノチューブのコントラストがより不鮮明になるとともに(図4-1)、それらの原子構造についても変化が見られた(図4-2)。高分解能TEM像より、ナノチューブ特有のグラフェン層の積層構造は見られてはいるが、所々で不連続な部位が観察された。さらに、局部的にはナノチューブが湾曲するとともに分断化していた。ナノチューブの分断化を示す典型的な高分解能TEM像を図5に示す。分断化が見られる箇所は、図中矢印で示してある。ナノチューブの構造劣化は、特にナノチューブの端部で顕著であった。なお、このようなナノチューブの分断化・構造劣化は一週間包埋後の試料ではほとんど観察されていない。

D. 考察

生体内に包埋されたカーボンナノチューブは、包埋期間の経過とともに分断化されつつ貪食細胞に取り込まれていく様子が観察された。さらに、包埋期間一年経過後では、カーボンナノチューブの原子構造の乱れ、あるいは結晶性の劣化が生ずることが高分解能TEM観察より明らかとなった。これらナノチューブの構造劣化は、主としてナノチューブ最表面のグラフェン層に多数の構造的欠陥が形成されることによると思われる。このような構造劣化は、特にナノチューブ端部で顕著であり、部分的にはグラフェン層の剥離が生じていることが明らかとなった。同様のカーボンナノチューブ層の剥離は、ナノチューブ最外層の欠陥部位を起点として生ずることも高分解能TEM観察により示された。このようなグラフェン層の劣化挙動は超臨界水中で観察されている。これら構造欠陥の形成は、水素あるいは水酸基と炭素の結合(C-HあるいはC-OH)がグラフェン最外層で形成されることに起因すると考えられている。

この時、水酸基などと結合した炭素はsp³混成軌道を形成する。一般的に、グラフェン層中の炭素原子は層内ではsp²結合を形成し、各グラフェン層間にはπ結合が生じている。しかし、最外層のグラフェン層中の炭素原子についてsp³結合が一度形成されると、グラフェン層間のπ結合に寄与していた電子が失われることになり、グラフェン層の剥離の原因となる。さらに、sp³結合は3次元的であり、sp²からsp³への結合状態変化は周囲のグラフェン層に歪みを誘起するため、グラフェン層の剥離を助長すると考えられる。一般に、sp²結合は強固な結合であり、容易にはsp³結合へと変化しないが、カーボンナノチューブの前処理過程で導入されていた欠陥部位がこれら構造変化の起点になりうると予期される。そのため、細胞内のような比較的弱い酸化環境下においてもナノチューブの分解が生じたと考えられる。

E. 結論

本研究では、ラット皮下にカーボンナノチューブを包埋し、一定期間経過後に取り出した生体組織片を観察対象とし、生体内におけるカーボンナノチューブの原子構造解析に向けた高分解能電子顕微鏡観察技法の最適化について検討した。はじめに、低加速透過型電子顕微鏡を用いることにより、注入したカーボンナノチューブの生体組織内における分散状況を調べた。さらに、超高压超高分解能電子顕微鏡を用いた高分解能TEM観察を併用することにより、生体内に取り込まれたカーボンナノチューブの原子構造についても検討した。生体内に包埋された直後のカーボンナノチューブは、大きさ数μm程度の凝集体として存在しているが、包埋期間の経過とともに部分的に凝集がほどけていき、1年経過後には一部がライソゾームに取り込まれていることが低加速TEM観察により示された。さらに、高分解能TEM観察からは、長期間生体内に包埋されたナノチューブの最表面には多数の構造的欠陥が存在し、部分的にグラフェン層の剥離が生じていることが明らかとなった。これは、生体内においてカーボンナノチューブの分断化が進行していること意味しており、細胞内のような比較的弱い酸化環境下においてもナノチューブの分解が生じることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Sakaguchi, F. Watari, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, "High-resolution electron microscopy of multi-wall carbon nanotube in the subcutaneous tissue of rats" *Journal of Electron Microscopy*, 58, 159 (2008)
2. N. Sakaguchi, F. Watari, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, H. Ichinose "Low-voltage and high-voltage TEM observations on MWCNTs of rat *in vivo*" *Bio-Medical Materials and Engineering*, in press

2. 学会発表

1. 坂口紀史、亙理文夫、横山敦郎、野田坂佳伸、市野瀬英喜 "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"、第3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、仙台市、2006
2. N. Sakaguchi, F. Watari, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, H. Ichinose "Low-voltage and high-voltage TEM observations on CNT of rat *in vivo*" International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (ISNT2008), Sapporo, Japan, 2008

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

無し

一週間包埋後

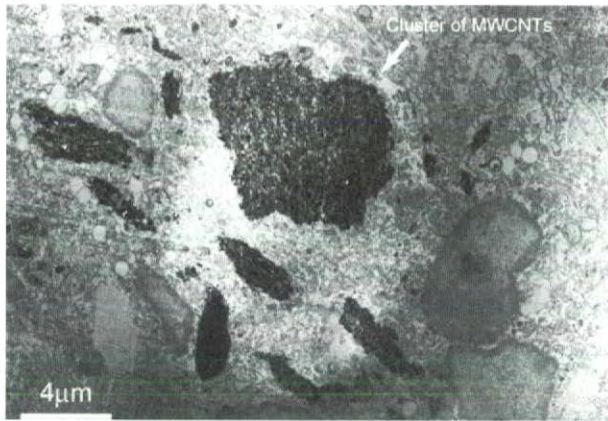


図 1-1

一年間包埋後

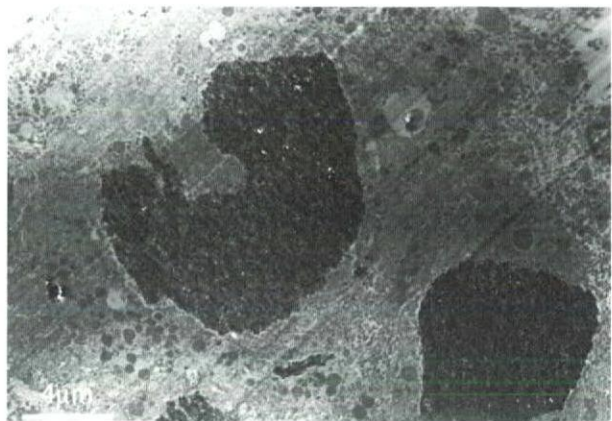


図 1-2

図 1 ラット皮下細胞組織と注入したカーボンナノチューブの TEM 像
(1-1 : 包埋後一週間、1-2 : 包埋後一週間)

一週間包埋後

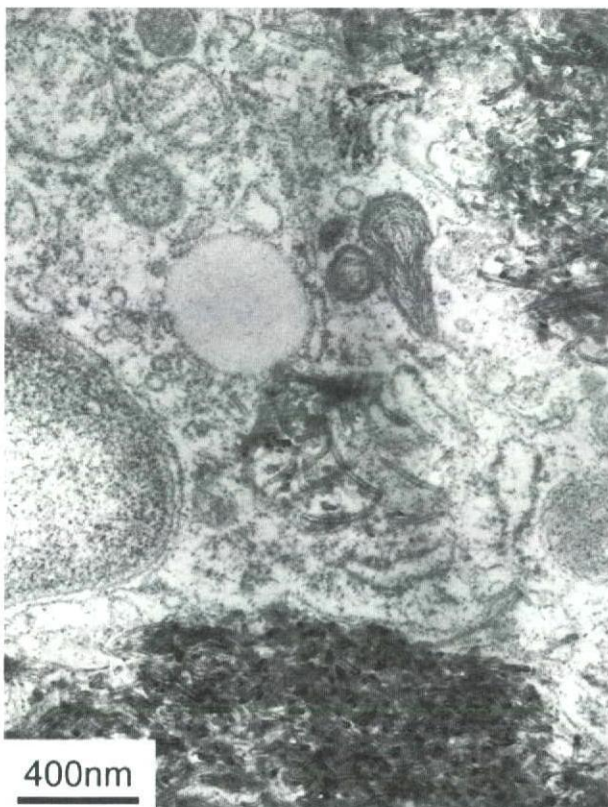


図 2-1

一年間包埋後

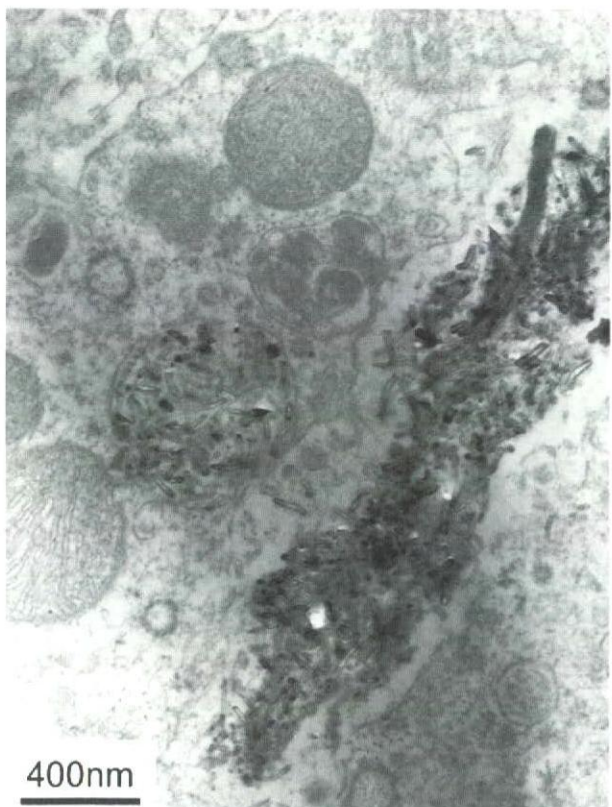


図 2-2

図 2 ラット皮下に注入したカーボンナノチューブの TEM 像
(2-1 : 包埋後一週間、2-2 : 包埋後一週間)

明視野像

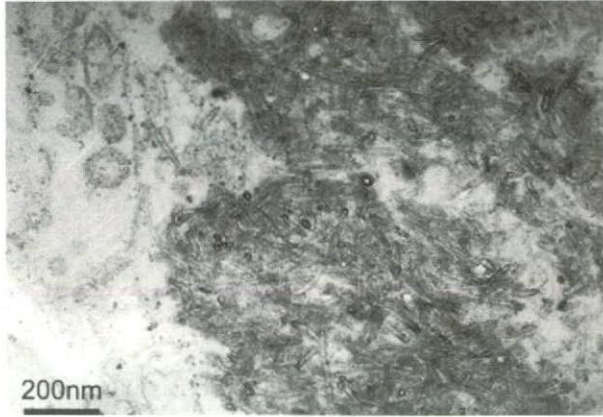


図 3-1

高分解能 TEM 像

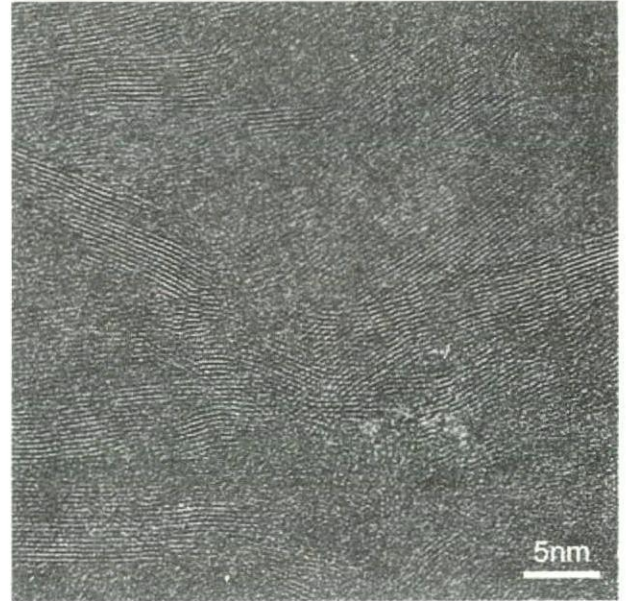


図 3-2

図 3 ラット皮下に一週間包埋したカーボンナノチューブの明視野像と高分解能 TEM 像
(3-1 : 明視野像、3-2 : 高分解能 TEM 像)

明視野像



図 4-1

高分解能 TEM 像

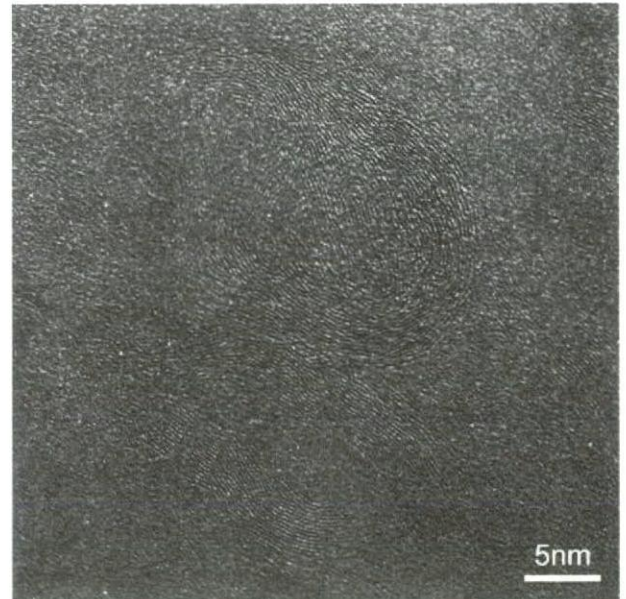


図 4-2

図 4 ラット皮下に一年間包埋したカーボンナノチューブの明視野像と高分解能 TEM 像
(4-1 : 明視野像、4-2 : 高分解能 TEM 像)

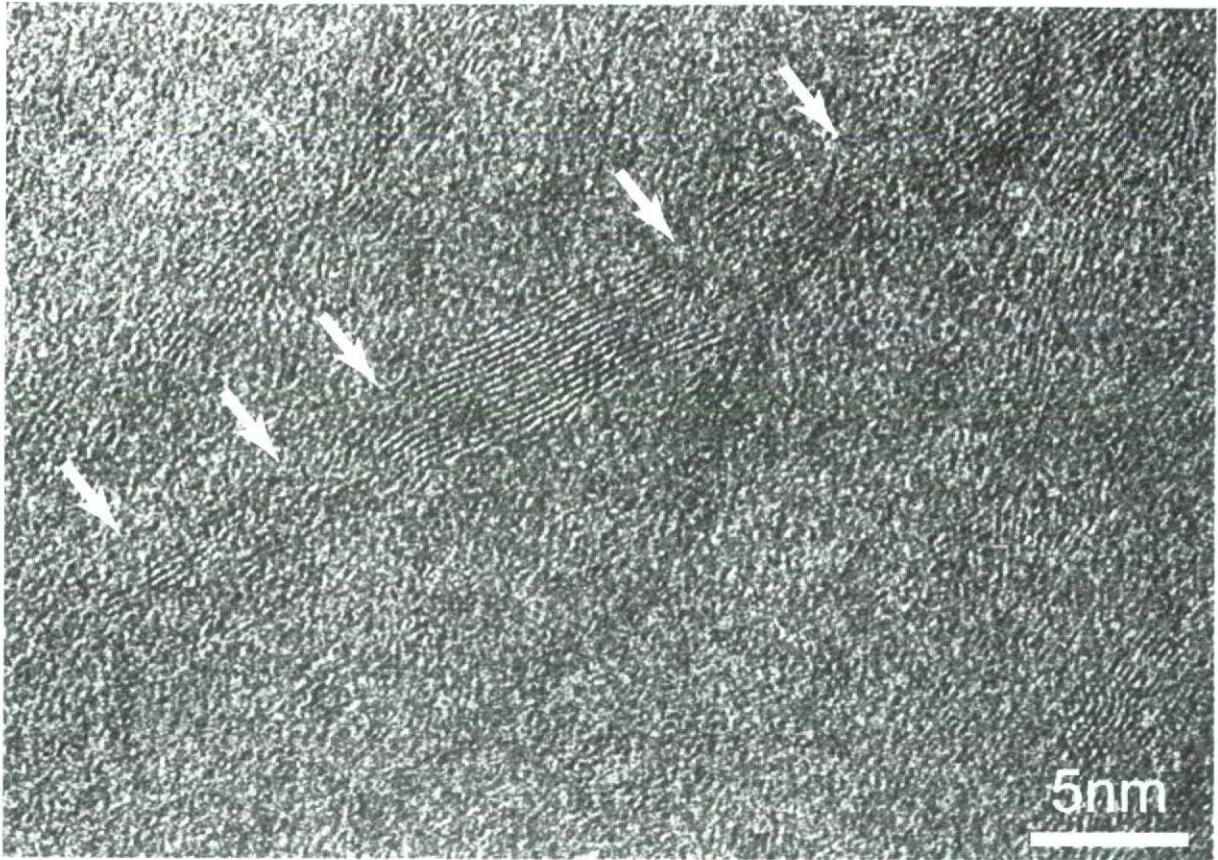


図5 ラット皮下に一年間包埋したカーボンナノチューブの高分解能TEM像

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

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

分担研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	芳賀信幸	石巻専修大学理工学部教授
研究協力者	羽田紘一	石巻専修大学理工学部教授
研究協力者	阿部大基	石巻専修大学理工学研究科研究生

研究要旨 ナノ粒子の細胞および生体に対する毒性評価法の確立は緊急課題のひとつである。本研究では、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、棒状カーボンナノチューブ、フェライト系磁性ナノ粒子、チタン系酸化物ナノ粒子、および銀ナノ粒子をモデルナノ粒子として、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。その結果、ゾウリムシはこれらのモデルナノ粒子に対して迅速で非常に再現性の高い応答を示し、バイオアッセイ系として優れた特性を持つことが明らかになった。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 μ 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。

A. 研究目的

我々は単細胞真核生物であるゾウリムシが生活史を通して、細胞の各領域において様々な細胞機能を同時に発現している細胞であることに着目し、哺乳類培養細胞系や酵母培養細胞系では検証することが困難な細胞機能も検査項目に含めてより包括的にナノ粒子の細胞毒性を評価するシステムの構築を目指してきた。

平成18年度は主に多層カーボンナノチューブと磁性ナノ粒子の細胞内取り込みと排泄の経時変化、細胞分裂への影響および子孫形成に対する毒性について調べた。平成19年度はフェライト系磁性ナノ粒子と銀ナノ粒子の細胞毒性評価に焦点を絞り、銀ナノ粒子に関しては毒性発現の経時変化を調べ、毒性因子の特定を行った。また、フェライト系磁性ナノ粒子に関しては、有性生殖過程に対する毒性評価を

行った。

さらに、平成20年度は、銀ナノ粒子の毒性発現の初期過程を解析し、細胞内タンパク分子の変化を分析するとともに、銀ナノ粒子分散液中の毒性を中和する物質の検索を行った。

また、平成20年度はゲノムプロジェクトが完了したヨツヒメゾウリムシを研究対象に加えて、細胞毒性発現に伴って変化する細胞内タンパク分子の検索とその遺伝子検索を行い、ナノ粒子の細胞毒性発現の初期過程を解析するための基本的なアプローチの方法を確立した。

B. 研究方法

ゾウリムシはレタスジュース培養法によって培養した。レタスジュース培養液に使用する前日に *Klebsiella pneumoniae* を接種し、25°Cで一晩静置培養

したものを使用した。ナノ粒子の細胞毒性評価は10細胞を一組とする培養系で行った。

多層カーボンナノチューブは NanoLab 社製 Multi walled CNT (番号 A1) を使用した。また、カーボンナノファイバーは Tohji (東北大学、仙台) によって合成されたものを使用した。

フェライト系磁性ナノ粒子はニッケルフェライトとコバルトフェライトを用いた。これらは Haneda (石巻専修大学、石巻) によって化学共沈殿法とそれに続く熱処理法により合成されたものである。スピネルフェライト前駆体は ferric acid と Ni salt または Co salt を含む水溶液を NaOH アルカリ溶液で中和することによって沈殿化し、種々の温度で加熱することによって様々なサイズの粒子からなるフェライト粉末を調製した。本実験では、数ナノメートルから数百ナノメートルのものを用いた。

銀ナノ粒子は希ガス中蒸発法によって作製した (Haneda、石巻専修大学、石巻)。毒性試験に用いたのは平均粒径が 17, 21, 28 ナノメートルのもので、粒子径は X 線回折のライン幅から算出した。

ナノ粒子の透析処理は粒子分散液を平均孔径 5 オングストロームの透析チューブを用い、蒸留脱イオン水に対して 13 および 24°C で 24 時間行った。また、光触媒効果を検討する際には、遮光した容器を用いた。

銀ナノ粒子分散液中で生成した銀イオンの定量は東北緑化環境保全 (株) に発注し、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) によって行った。

C. 研究結果

本研究によって確立した、ゾウリムシバイオアッセイ系の試験手順を図 1 に示した。() 内の番号に従って毒性試験を行うと、ナノ粒子の細胞毒性を生存に対する影響、無性生殖に対する影響、有性生殖に対する影響の順に体系的に評価できる。

表 1 にナノ粒子の細胞内への取り込み速度、定常状態での平均食胞数および排泄速度を示した。一分間当たりの取り込み速度はコバルトフェライトが最大で 1.3 個であったが、銀ナノ粒子は全く取り込まれなかった。また、定常状態での平均食胞数は多層カーボンナノチューブ、コバルトフェライト、酸化チタンがほぼ同程度に高い値を示したが、ニッケル系のナノ粒子は取り込まれにくいことが明らかにな

った。

図 2 に酸化チタンとコバルトフェライトナノ粒子を取り込んだゾウリムシを示した。これらの細胞は遊泳行動、細胞増殖、接合能力の発現などにおいて細胞毒性は全く認められなかった。

ゾウリムシを銀ナノ粒子分散液に移すとただちに遊泳行動に異常が生じ、すべての細胞が後方遊泳を行い、数分のうちに細胞体の変形を伴い遊泳を停止し、やがて細胞死に至った。図 3 に細胞死に至る直前の細胞を示した。

図 4 に示す処理によって細胞死を誘導し、その後細胞の全タンパク成分を SDS-PAGE で分離し、ペプチドバンドのパターンを比較した。銀ナノ粒子分散液および硝酸銀処理した細胞にだけ、黒枠で囲った領域に特異的なペプチドバンドが出現した。ゾウリムシ (a) とヨツヒメゾウリムシ (b) で比較すると、分子量に若干の違いが認められたが、ほぼ同じ大きさのポリペプチドが確認された。

次に、この領域のゲルを切り出し、アミノ酸分析にかけた結果、NCBI と Paramecium DB の両方で 2 種類の遺伝子がヒットした。一つは、 β チューリンで、もう一つは機能が未知の遺伝子であった。未知の遺伝子については、他の多くの生物にも存在しているが、どの生物でもその機能がまだ解明されていないということである。

図 5 にヒト血清アルブミンの銀ナノ粒子分散液細胞毒性に対する中和効果を示した。最大濃度 500 μ g/ml までで、中和作用は濃度依存的に表れることが明らかになった。また、牛乳などに含まれるたんぱく質カゼインでも同様の中和作用があることがわかった (データは示さない)。

D. 考察

本研究で確立したゾウリムシをバイオアッセイ系とするナノ粒子の細胞毒性評価法は、水溶液に分散するナノ粒子ならどのようなタイプの物質でも検査できることがわかった。また、検査可能な項目は、生存、無性生殖、有性生殖のどのカテゴリーにも適用できることが明らかになった。

ナノ粒子の細胞毒性発現と細胞内取り込み量との間には明白な相関関係は認められなかった。一方、銀ナノ粒子の細胞毒性の主要因は銀イオンであることが証明されたので (平成 19 年度報告書)、今後は

ナノ粒子とともに、それらのナノ粒子から派生的に生成される物質についても配慮した検査方法が必要である。

E. 結論

ナノ粒子の細胞毒性評価に単細胞個体ゾウリムシは迅速で再現性が高く、他の細胞系では検査することが困難な細胞機能に関しても高感度で検査できるバイオアッセイ系を提供することが明らかになった。

今後は、ゾウリムシのバイオアッセイ系をヒトの健康に対する安全基準と関連付けてさらに詳細な検討がなされなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Yada, T. Abe and N. Haga. Studies of *Paramecium caudatum* by means of scanning electron microscope and projection X-ray microscope. Bio-Medical Materials and Engineering. (in press) (2009).

2. Y. Takenaka, A. Yanagi, H. Masuda, Y. Mitsui, H. Mizuno and N. Haga. Random insertion of injected DNA molecules into the macronuclear chromosome of *Paramecium caudatum*. Jpn. J. Protozool. 41: 159-168 (2008).

3. N. Haga and K. Haneda. *Paramecium* as a bioassay system for elucidation of cytotoxicity and biocompatibility of nanoparticles: effects of carbon nanofibers on proliferation and survival. Jpn. J. Protozool. 40: 139-146 (2007)

4. Y. Takenaka, A. Yanagi, H. Masuda, Y. Mitsui, H. Mizuno and N. Haga. Direct observation of histone H2B-YFP fusion proteins and transport of their mRNA between conjugating *Paramecia*. Gene 395: 108-115 (2007)

5. 芳賀信幸 “単細胞個体・ゾウリムシのカーボンナノチューブ細胞内摂取のリアルタイム観察” J. Japan Society for Biomaterials, 24: 319-323 (2006)

2. 学会発表

1. T. Abe and N. Haga, Cytotoxicity mechanism of Ag particles in *Paramecium*. Jpn. J. Protozool. 42: 36-37 (2009)

2. H. Sasaki and N. Haga, Method for cryopreservation of *Paramecium caudatum*. Jpn. J. Protozool. 42: 16-17 (2009)

3. N. Haga and T. Abe, Studies on immaturin, a sexual rejuvenescence molecule in *Paramecium*, by polyclonal antibody. Jpn. J. Protozool. 42: 62-63 (2009)

4. N. Haga, et al. Transport of histone H2B-mRNA and sharing use of histone H2B among old and young nuclei in *Paramecium caudatum*. 78th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Abstracts. p53 (2007).

5. H. Sasaki and N. Haga. Characterization of cold tolerance cytoplasmic factor in *Paramecium*. 78th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Abstracts. p54 (2007).

6. N. Haga. A wild stock expressing two different types of syngen-specific mating types in *Paramecium*. 40th Annual Meeting of Japan Society of Protozoology, Abstract. p20 (2007).

7. T. Abe and N. Haga. Cytotoxicity test of Ag particles in *Paramecium*. 40th Annual Meeting of Japan Society of Protozoology, Abstract. p20 (2007).

8. 阿部大基, 芳賀信幸, “ゾウリムシの接合過程に対するコバルトフェライトおよび酸化チタンの影響”, 第二回「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」研究成果発表会講演要旨集, 35, 徳島県, 鳴門市(2007).

9. 芳賀信幸, “リアルタイム観察によるゾウリムシのナノ微粒子摂取行動と細胞内動態” 第三回「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」研究会講演要旨集, 30, 宮城県, 仙台市, (2006)

10. 芳賀信幸, “ゾウリムシの微粒子摂取行動と細胞毒性評価” 第28回日本バイオマテリアル学会大会予講集, 68, 東京, (2006)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

・・・なし・・・

2. 実用新案取得

・・・なし

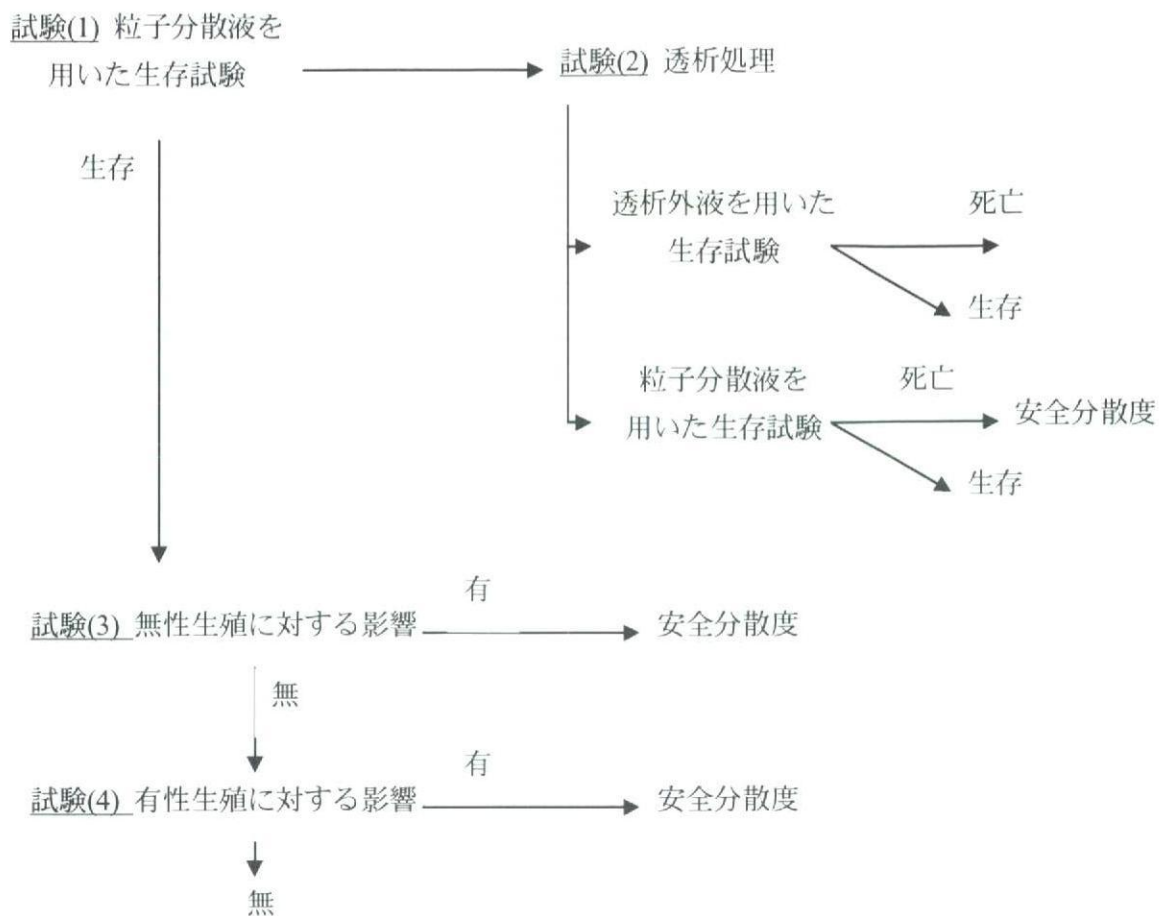


図1 ゾウリムシを用いた細胞毒性試験の概要

各粒子の毒性試験は上図に記す試験番号に従って行った。

表1 ナノ粒子のゾウリムシ細胞内動態

Nanoparticles	Ingestion (Number / min)	Stationary number (Number)	Extrusion (Number / min)
Multi walled CNT	1.0	30	1.2
CNF	0.8	23	—
CoFe ₂ O ₄	1.3	33	0.6
NiFe ₂ O ₄	0.1	3	—
TiO ₂	0.8	30	0.6
NiO	0.3	10	—
Ag	0	0	—

*Number は細胞内の食胞数を表す。Stationary number は食胞数が定常期に達したときの平均値の概数である。—は未測定。

*実験に用いた細胞はすべて子孫の生存率が高い、比較的若い細胞である。

*ナノ粒子は K-DS に分散したものをを用いた。



図2 左図は酸化チタンナノ粒子、右図はコバルトフェライトを取り込んだゾウリムシ。

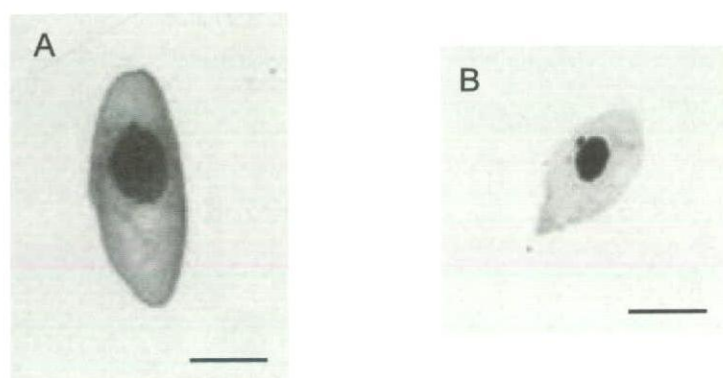


図3 銀ナノ粒子分散液中での細胞の形態変化

A: コントロール細胞、B: Ag 粒子分散液中での死細胞。バーは 50 μ m。

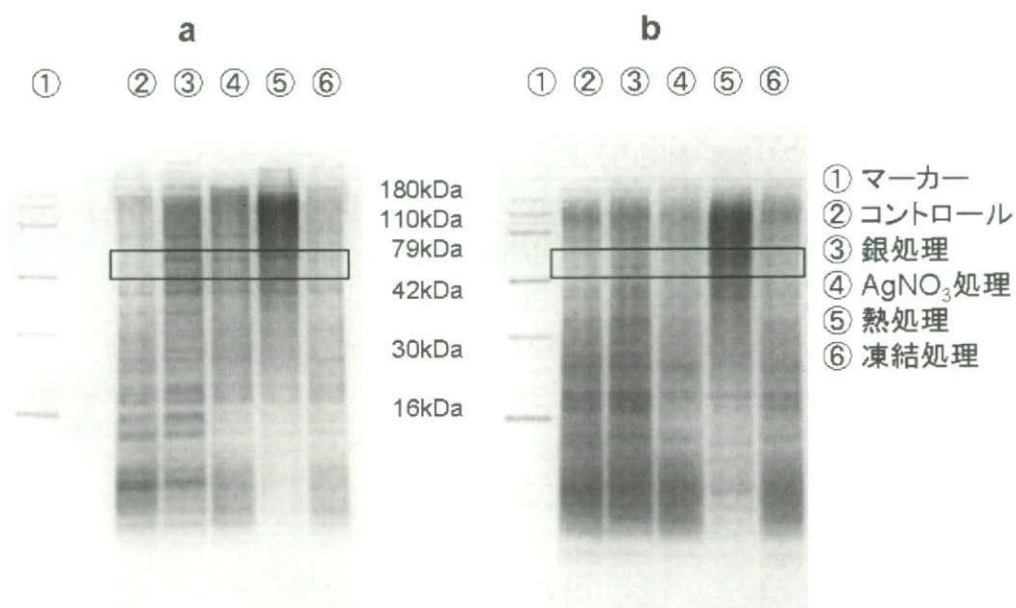


図4 ゾウリムシの全細胞を用いた SDS-PAGE の写真。ペプチドバンドは銀染色法によって染色した。中央の数値はマーカー分子の分子量を示す。○中の数字は実験処理方法を表す。②は無処理の細胞のポリペプチドパターン、③は銀ナノ粒子分散液処理、④は硝酸銀溶液処理、⑤は 100°C 5分、⑥は -20°C で 5分凍結した細胞である。a はゾウリムシ、b はヨツヒメゾウリムシ。

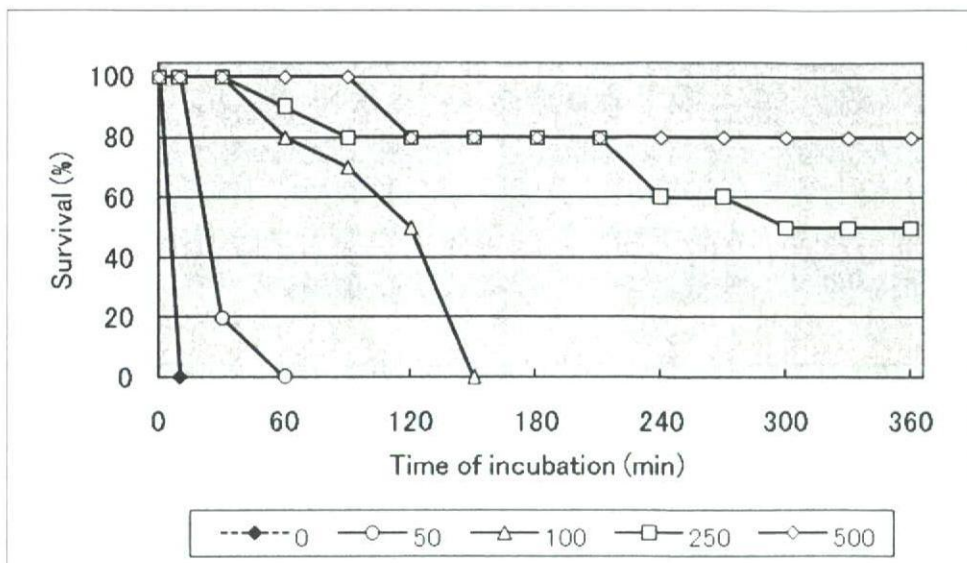


図5 ヒト血清アルブミンの銀ナノ粒子分散液細胞毒性に対する中和効果
 ヒト血清アルブミンを0から500 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度で銀ナノ粒子分散液と混合し、ゾウリムシに投与した。毒性に対する中和作用は濃度依存的である。横軸は処理時間(分) 縦軸は10細胞での平均生存率である。

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

ゾウリムシの X 線顕微鏡による観察—I, II

研究協力者 矢田慶治、東北大学名誉教授
研究協力者 安倍大樹 石巻専修大学理大学院博士コース学生
分担研究者 芳賀信幸 石巻専修大学理教授

研究要旨 研究においては、分解能が 0.1 ミクロン程度の X 線顕微鏡でゾウリムシを観察し、在来行われてきた光学顕微鏡及び走査電子顕微鏡 (SEM) による知見との比較を行った。試料は通常の方法で培養したゾウリムシを自然乾燥したものと、グルタールアルデヒドもしくはオスミウム酸で固定後臨界点乾燥もしくは凍結乾燥したもので、両者の間には、SEM 像のみならず、X 線像に大きな差異が見られた。特徴的なことを列挙する。(1) 自然乾燥試料の X 線像は極めてコントラストが悪いが、1.04 nm の $L\alpha$ 線を出す Ge ターゲットを使うと内部構造及び繊毛を認めることが出来た。しかし、自然乾燥に伴う扁平化のため、極めて不満足な像である。(2) グルタールアルデヒドもしくはオスミウム酸で固定後臨界点乾燥や凍結乾燥をした試料では、形態がよく保存され、SEM で網目状体表面構造、繊毛等が綺麗に観察された。(3) これら固定をした試料の X 線像ではコントラストが向上し、特にオスミウム酸固定では Au ターゲットを使用しても十分な程度のコントラストがつく。(4) X 線像では体表面の網目構造及び繊毛にコントラストがあまりつかないが、それに代わって、オスミウム酸固定の場合には特に、光学顕微鏡では認められないトリコシスト (毛胞) と思われる構造が見られた。(5) 内部器官の存在が明確に認められた。

A. 研究目的

ゾウリムシは、細胞生理学的な研究に非常に適した材料で、今まで光学顕微鏡、透過型及び走査型電子顕微鏡などで多くの研究が行われてきた。これらの観察法は夫々特徴を持つが、そのうち生きてまま動的な観察が出来るのは光学顕微鏡法だけである。最近 X 線投影顕微鏡の分解能がサブミクロンに達し、更にナノメートルまで改善されつつある。十分なコントラストを付けることができれば相補的な興味ある知見が期待でき、光顕よりも良い分解能での動的観察も最終目標として考えられるので、その第 1 歩としてゾウリムシの観察を行った結果を報告する。

B. 研究方法

用いたゾウリムシ (*Paramecium Caudatum*) は以下の 3 種類の試料を用意した：1) 通常の方法で培

養し自然乾燥をしたもの、2) 培養後グルタールアルデヒド(5%)もしくはオスミウム酸で固定、乾燥したもの。固定した場合の乾燥には、臨界点乾燥、もしくは凍結乾燥を用いた。臨界点乾燥はよく知られた定法によった。凍結乾燥は、固定後 t-ブチルアルコールで置換し、真空排気によって凍結気化する方法を採った。これらの試料は電顕用のメッシュ (100 メッシュ程度) に PVF 膜を張り、カーボンコートをし、極少量の接着剤を付けてから実体顕微鏡下で張り付けたものを観察した。観察には 0.1 ミクロンの分解能を持つ X 線顕微鏡 TUX-5000F と X 線顕微鏡としても使える走査型電顕 DS-130 を用いた。走査電顕として観察する場合は電子線によるチャージングを避けるために予め薄くカーボンを蒸着した。

C. 研究結果

図1は自然乾燥をした試料をSEMで電圧を4kV, 5kV, 6kV, 15kVと変えて観察した像である。加速電圧によって見え方が著しく変わることが判るが、表面構造に関しては5-6kVが適しており、体周辺に多数の繊毛が見られる。15kV以上に上げると内部構造が見られるようになることが判る。図2は5kVで撮ったSEM像を拡大して示す。表面構造と繊毛がよく見られるが、自然乾燥に伴う収縮のため、体表面と繊毛の間に間隙が出来ていることが判る。図3は、同じ個体のX線像と光学像を較べたものである。X線像はGeターゲットを用い10kVで撮っているので1.04nmのGe L α 線が優位で、かなりコントラストがつく条件であるにもかかわらず実際のコントラストは極めて悪い。しかし、内部構造と思われる透けた丸い構造はSEMともLMともよく対応している。このことは自然乾燥で扁平化したために細かい構造のコントラストが出ないことを暗示している[1]。そこで次に固定してから臨界点乾燥、もしくは凍結乾燥を試みた。固定にはオスミウム酸とグルタルアルデヒドの2種類を用いた。

1 オスミウム固定の場合

図4は、オスミウム酸固定後t-ブチルアルコールで置換し、凍結乾燥をした試料のSEM像で左右2つの像は10度傾けたステレオ像である。図5は同じ個体の中央部分を拡大して撮影したステレオ像である。表面の網目状構造と繊毛の様子が立体的に観察できる。図6は、図4と同じ個体のX線像でその下部に対応したステレオ像である。特徴として言える事は、SEM像に見られた表面の網目構造と繊毛がはっきり見えないで代わりに短い繊維状の構造が一面に見えること、内部器官と思われる核のような構造が見えることである。図7は同じくオスミウム酸固定で凍結乾燥をした個体のX線像であるが同様に網目構造の代わりに繊維状構造と内部器官が見られる。

2 グルタルアルデヒド固定の場合

図8はグルタルアルデヒド固定後凍結乾燥をした試料のステレオSEM像である。低倍率像とその一部を拡大した像を並べてあるが、立体視には横から見てもらいたい。体表面の網目構造と繊毛が綺麗に見られ、繊毛が矩形をした土手の中から生えていることがよく判る。図9は同じ個体のX線像である。オスミウム酸固定のものに比べ、コントラストが低い、表面の網目構造がうすく見られ、また内部器官も見られる。一方、オスミウム酸固定で見られた

短い繊維状構造はそれ程明瞭でない。

D. 考察

ゾウリムシを自然乾燥して試料とした場合、SEM観察、X線顕微鏡観察とも明瞭な像が得られないが、オスミウム酸もしくはグルタルアルデヒドで固定すると表面並びに内部とも構造がよく保存され、Geターゲットより硬いX線を出すAuターゲットでも充分な程度のコントラストが得られる事がわかった。これは筆者がウニの卵をX線顕微鏡で観察した時と同様な知見である[1]。しかし、固定液によるX線像の違いも見られた。即ち、オスミウム酸固定の試料のX線像では表面の網目構造及び繊毛は観察されず、細い繊維構造が現れる。この構造を検討した結果、筆者は蛋白質から成るトリコシスト(毛胞)[2]がオスミウム酸で固定のみならず染色の作用を受けてX線像に強いコントラストを与えたものではないかと考えている。在来、トリコシストは電顕で観察され、光顕では特殊な色素で染色して観察されていたが、今回X線顕微鏡で始めて観察されたものと思われる。グルタルアルデヒド固定は、X線像でのコントラストは少し弱い、細部の構造はオスミウム酸固定よりもよく保存されているように思われるので、今後Geターゲットでコントラストをつけること或いはグルタルアルデヒドとオスミウム酸との2重固定をすることが有効であるように思われる。また、内部器官観察にはCT観察も有望であると思われる。

E. 結論

1. オスミウム酸もしくはグルタルアルデヒドでゾウリムシを固定してから、臨界点乾燥もしくは凍結乾燥を行った。
2. SEM観察から、どちらの固定法でも表面構造がよく保存される。
3. X線像からは、SEM像とかなり異なる構造が見られ、特にオスミウム酸固定の場合、細胞膜の下にあるトリコシスト(毛胞)がみられる。また、内部器官が観察された。
4. オスミウム固定では充分なコントラストが得られるので、今後内部器官観察にCT観察が有望であると思われる。

文献

- [1]K.Yada,K.Shinohara,Y.Hamaguchi, Proc. 5th Internat.Cnf. XRM Wurtzburg, Germany1996 II -255