

るTi元素分布像である(文献12)。吸引後のラットの体内におけるTiO₂の全身分布を示している。およそ50 nm以下のナノ粒子は、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、肺から直接血中に取り込まれ、全身に拡散することを示している。こうした微粒子は、材質や大きさによって細胞死を導きその場に蓄積するものと、血流によって他臓器に到達蓄積するものがある。薬剤の場合は意図的に血液に投与されるのに対し、これらは意図せずして血中に侵入し回流する効果である。

形状効果——アスベスト効果

図3で示したサイトカインIL-1 β 産生の微粒子サイズ依存性試験を、TiO₂を用いて球状ないし塊状微粒子(直径)と針状微粒子(長径)について比較すると、塊状微粒子では図3のTi微粒子と同様に、10 μ mでは3 μ m以下に比べてIL-1 β 産生量が著しく低いのに対し、針状微粒子では10 μ m以上でもなお3 μ m以下のレベルに近い産生量を示し、高い刺激性を示すことが定量的に示される(文献12)。

アスベストの発がん性はよく知られているが、アスベスト自体は粘土鉱物の一種であって、本来材質に為害性があるわけではない。粉末形状が針状結晶であるために生ずる物理的微粒子為害性効果が第一の要因である(文献13)。アスベストと総称される繊維状鉱物のうち、代表的なクリソタイル(白石綿)、クロシドライト(青石綿)、アモサイト(茶石綿)をSEM観察すると、クリソタイルでは比較的湾曲した形態を示すのに対し、発がん性が高いとされるクロシドライト、アモサイトでは顕著な針状形状を示し、またEDS元素分析

を行うと、多量のFeを含有している。

図5はクロシドライトとカーボンナノチューブを混合し、水中かくはん後、乾燥させたときのSEM像である。図の左半分に個別に分散しているものも含め、針状粒子はクロシドライトで、カーボンナノチューブの大部分は、中央から右にかけての微粒子集合体の内部に凝集している。カーボンナノチューブの形態が屈曲性に富み、疎水性で凝集しやすいのに対し、アスベス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する。それらの中には気管支を通過し、肺胞に達するサイズのものが多数含まれている。アスベスト代替品(アルミナ)では、直径が5~10 μ m、長さが数10 μ mあり、形態の観点からも気管支を通過しにくい大きさになっている。

カーボンナノチューブのバイオ特性

カーボンナノチューブは、主として電子エミッター、燃料電池などの材料として、電子、化学分野で注目されているが、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、肺がん誘発性のあるアスベストとの形状の類似性の連想から、カーボンナノチューブにも重大な為害性の可能性があるという懸念が、ナノトキシコロジーの典型例として出されてきている(文献14)。

筆者らの細胞機能性試験、動物埋入試験からは、バイオインテグレート材料一般に起きる程度の微粒子刺激性はもつものの、短中期的には、アスベストに見られるような特異的な生体為害性は認められず(文献4~6)、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が多数見いださ

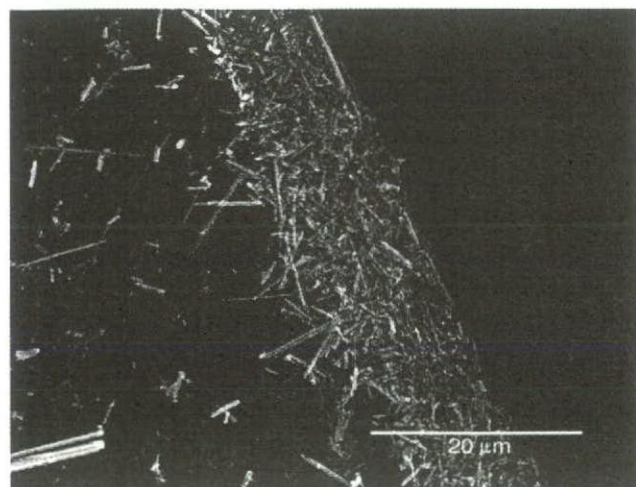


図5 アスベスト(クロシドライト)の分散性(写真左側)とカーボンナノチューブの凝集性(写真中央内部)

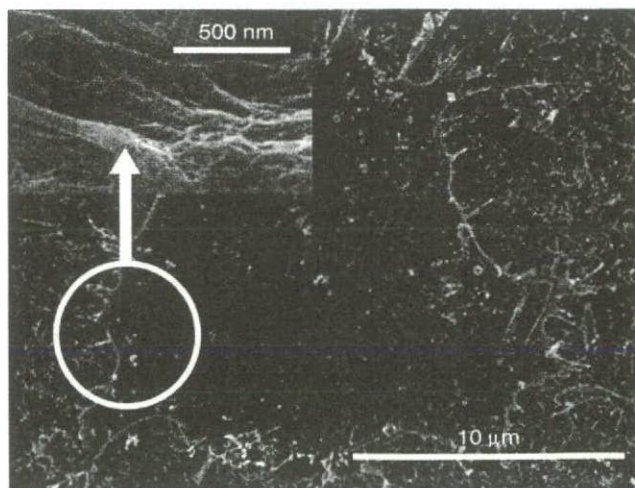


図6 カーボンナノチューブスカフォールド上の培養細胞は高い増殖・伸展性を示し、末端から多数の細胞突起を張り出し強く付着する

れた。バイオ用カーボンナノチューブの開発 (文献7, 8), 糖鎖・アパタイトによる表面修飾, 細胞培養・組織再生用の足場 (スカフォールド) (文献9, 10) などのバイオ応用のための開発を行っている。

図6はカーボンナノチューブを細胞培養のスカフォールドとして用いた際の結果である。元素的には同じカーボンでありながら, グラファイトでは細胞や血球が附着しにくい抗血栓性を有することから人工心臓弁材料として使用されているのに対し, カーボンナノチューブ上では, 細胞は高い附着・伸展性と増殖性を示し, 末端から多数の細胞突起を張り出し強く附着する (文献10)。

結 論

およそ100 μm 以上のTi粒子は, 巨視的サイズのインプラント (文献11)と同様の生体親和性を示すが, 50 μm 以下では刺激性が亢進し, 特に10 μm 以下になると貪食作用を誘発し, 長期間炎症反応をひき起こす (文献1)。このような効果は, Ti, Feの金属, TiO_2 , 磁性微粒子の酸化物, ポリ乳酸の高分子のいずれの材料にも見いだされ, 物質によらない効果であると考えられる。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。

すなわち, 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效果が支配的であるが, μm ~ nm になるとバイオアクティブ, バイオイナート材料でも, 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。その為害性の程度は, 細菌内毒素に比べると1/1000以下と低い, 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る。バイオアクティブ, バイオイナート材料の場合, こ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が, 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至るアスベスト禍のような効果も可能性として考えられる。

材料のナノサイジングにより化学反応性は亢進するから, 人間の意向とマッチすれば高機能性となるが, 意図せずして為害性に働くナノトキシコロジーとして現れたとしても決して不思議ではない。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。このナノトキシコロジーという用語はナノテクノロジーに対応し, わかりやすい。しかし, 微粒子に特有な生体反応特性は μm 付近から開始し, さらに長期的な組織埋入試験では100 μm 付近から現れる。この意味で, 微粒子効果という観点からは必ずしも正確な用

語ではない。

筆者らは, ナノテクノロジーの人体へのバイオ応用には, あらかじめ起こりうる生体反応と条件を把握する必要があるということデータをに基づき提起してきたが, 日本では必ずしも認知されていない。この間, 必ずしもデータが出て先行しているわけではない欧米が, 積極的に世界標準や規制といった観点から国際的な枠組みをまず構築し, 主導権を握りつつあり, 日本は後発的に参加しようとしている。日本の科学の展開に特徴的な推移である。しかし, 生体反応性への材料のマイクロ/ナノサイジング効果の解明と制御は, ナノテクノロジーの進展にとって, 材料学的にも医学的見地からも新たな大きな発展につながる本質的な学問分野である。今後, 製品の開発後に安全性をチェックするという姿勢から, 社会的責任からもトータルな経済性の観点からも, 当初から応用と安全性をセットにした開発と商品化を行う体制へと, 時代の趨勢は赴くことになるだろう。

参 考 文 献

1. R. Kumazawaほか, *Biomaterials*, **23**, 3757 (2002).
2. K. Tamuraほか, *Materials Transactions*, **43** (12), 3052 (2002).
3. 亙理文夫ほか, “微粒子と生体反応”, ナノ学会会報, **2** (1), 33 (2003).
4. A. Yokoyamaほか, *Nano Lett.*, **5** (1), 157 (2005).
5. K. Kiuraほか, *J. Biomed. Nanotechnology*, **1**, 359 (2005).
6. Y. Satoほか, *Mol. Biosys.*, **1**, 176 (2005).
7. Y. Satoほか, *Mol. Biosys.*, **1**, 142 (2005).
8. M. Ushiroほか, *Phys. Rev. B*, **73**, 144103/1-11 (2006).
9. S. Liaoほか, *Biomaterials*, **26**, 7564 (2005).
10. N. Aokiほか, *Chem. Lett.*, **35** (5), 508 (2006).
11. F. Watariほか, *Composites Science and Technology*, **64** (6), 893 (2004).
12. 亙理文夫 編, 厚生労働科学研究補助金 萌芽の先端医療技術推進研究事業 ナノメディシン分野 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」, 1~377 (2005); 亙理文夫 編, 同平成16/15/14年度総括・分担研究報告書, (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).
13. 亙理文夫 編, 「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」第1回研究会抄録集, p.1~35 (2005); 第2回研究会抄録集, p.1~45 (2006).
14. 松田正己, 現代化学2005年12月号, p.14.

材料のナノサイジングと生体反応性



亘 理 文 夫*

JJSB

Nanosizing of materials and tissue reaction

The development of DDS is expected for the administration of anticancer agent and gene transfection. On the other hand, biocompatible Ti causes inflammation as abraded fine particles and asbestos, a kind of clay minerals, induces mesothelioma after a long-term, large quantity of exposure. The effect originating from fine particles contributes to these phenomena, apart from the material properties of either toxicity or biocompatibility. It is necessary to establish the proper understanding and principle on the biological reactivity of micro/nanoparticles in advance to develop the biomedical application for human beings. Biocompatibility in bulk is material-dependent based on the chemical properties due to the ionic dissolution. In addition to this, non-specific cytotoxicity arising from the physical size and shape effect is pronounced in the micro/nano scale. Nanoparticles might be the objects whose existence has not been assumed by living body defense system. They have both sides of high functional nature and stimulus, and their control is important. The biotechnology application of carbon nanotubes is also described.

DDSは抗がん剤投与や遺伝子導入に開発が期待されている。一方、生体親和性にすぐれるチタンは、摩耗粉では炎症を引き起こし、粘土鉱物の一種アスベストは長期大量に被曝すると中皮腫を発症する。こうした現象にはたんに材質が毒性か生体親和性かという特性とは別に、微粒子に起因する効果が寄与していると考えられる。

ナノテクノロジーの人体へのバイオ応用には予めマイクロ/ナノ微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。マクロでの生体適合性はイオン溶出性などの化学的特性に基づく材質に依存するが、マイクロ/ナノではこれに加え、微粒子のサイズ、形状に依存する物理的效果に基づく刺激性も顕在化する。ナノ微粒子は生体防御機構が想定していない対象である可能性があり、高機能性と刺激性の両面を併せ持ち、その制御が重要である。

本稿では、これらについて述べるとともに、カーボンナノチューブのバイオ応用性についても述べる。

Fumio Watari*

Key words: 微粒子, 生体適合性, ナノトキシコロジー, 生体防御機構, カーボンナノチューブ

材料のナノサイジングと生体反応性

1900年にマックス・プランクが発見して以来、量子力学は、サイズが小さくなると巨視的なニュートン力学とは挙動の異なる電子や光子の世界があることを明らかにした(図1)。20世紀後半から今日の21世紀の世界は、まさにIC、レーザーなどを生み出し

た量子力学のうえに社会がなりたっているといっても過言ではない。材料もナノサイズになると、表面に占める原子数の割合が体積内部の原子数と同程度になり、また、量子効果の影響によるバンド構造の変化もあらわれはじめ、新たな特性が発現する。

こうした材料のナノサイジングに対して、生体はどのように反応するのであろうか。ナノサイジングによる材料自体の特性変化はもちろん影響するが、それだけに留まらない。生体組織との相対的な関係で発生する効果もあらわれてくるのである。

Tiは耐食性も高く、金属中、最も生体親和性にすぐれ^{1,2)}、インプラントに使われているが、耐摩耗性に劣り^{3,4)}、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。

* Biomedical, Dental Materials and Engineering, Department of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体理工学教室 [略歴] 1971年 東京大学工学部金属工学科卒業。1976年 東京大学大学院工学系研究科修了。1976年 ベルギー国立原子力研究所ならびにアントワープ大学材料科学科研究員。1978年 アリゾナ州立大学物理学科研究員。1982年 東北大学科学計測研究所助手。1984年 東京医科歯科大学歯学部歯科理工学第一講座助手。1993年 北海道大学歯学部歯科理工学講座教授。2000年 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座教授、現在に至る。

最近改めて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、長期大量に吸引曝露すると、約30年経て中皮腫を発症するに至る。こうした現象には、たん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。

カーボンナノチューブは電子エミッター、燃料電池など、電子、化学分野で注目されているが、バイオ応用に注目した研究はほとんどなされていない。欧米からは肺がん誘発性のあるアスベストとの形状の類似性による連想から、重大な為害性があるという論調が出されている。

抗がん剤は投与すると、しばしばがん患部に到達する前に健常組織に吸収され、体力を損う副作用として働いてしまう。DDS(ドラッグデリバリーシステム)はこうした欠点を回避し、特異的に作用する結合基を付けて血流に乗せて移送し、がん患部にのみ薬剤を投与しようとする代表的なナノパーティクルのバイオ応用例である。その実現のためには生体組織との相互作用の情報が必須の前提となる。

こうした材料の微細化に伴う生体反応挙動は、今後の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が、いまだ未知な部分が多い。筆者らは他に先駆け研究を進めてきており、本稿ではそのデータに基づき、現象の全体を俯瞰することしよう。

材料と生体反応(マクロ, *in vivo*)

微粒子の生体反応をみる前に、まず通常の場合、すなわちマクロサイズのものに対する組織反応性をみておこう。

はじめに、各種金属をラット皮下に1週埋入したときの周囲軟組織を示す(図2)。Niでは組織が壊死し、強い為害作用を示すが、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小さく、すでに被包化している。

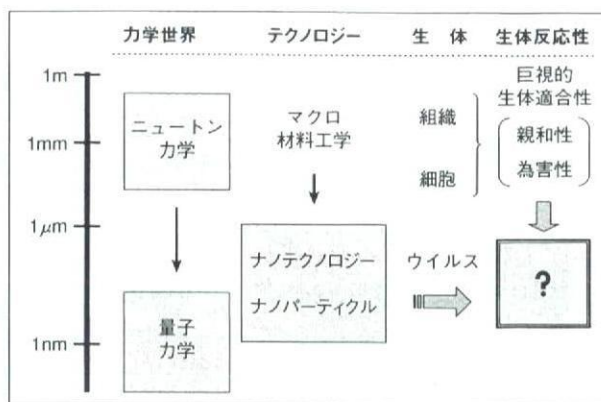


図1 ナノテクノロジーの力学世界、生体との関係、および材料のマイクロ/ナノサイジングと生体反応性の関連

このFeの反応はTiと類似しているが、より詳細にみると細胞核の密度、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。Agは、いまだ線維性結合組織は形成途中である。各材料の生体適合性の程度に敏感に反応し、材質に依存して組織反応性が変化していることがわかる⁵⁾。

微粒子の生体反応性 (*in vitro*)

つぎに、マイクロ/ナノ微粒子の生体反応性を *in vitro* 細胞機能性試験の結果で示す。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細胞生存率を図3に示す。好中球は、白血球の約50%を占める5~10µm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。微粒子サイズが150µmから0.5µmへ順次小さくなるにつれ、生存率は減少している⁶⁾。

このとき、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)の活性値は細胞破壊または死滅率の一つの指標であるが、微粒子サイズが小さくなると増加し、細胞生存率と非常によい逆相関を示し、ともに微粒子サイズに依存している。

また、ヒト好中球からの活性酸素産生量を測定すると、同様に粒径が小さくなるとともに産生量が増加し、典型的なサイズ依存性を示した。Ti微粒子サ

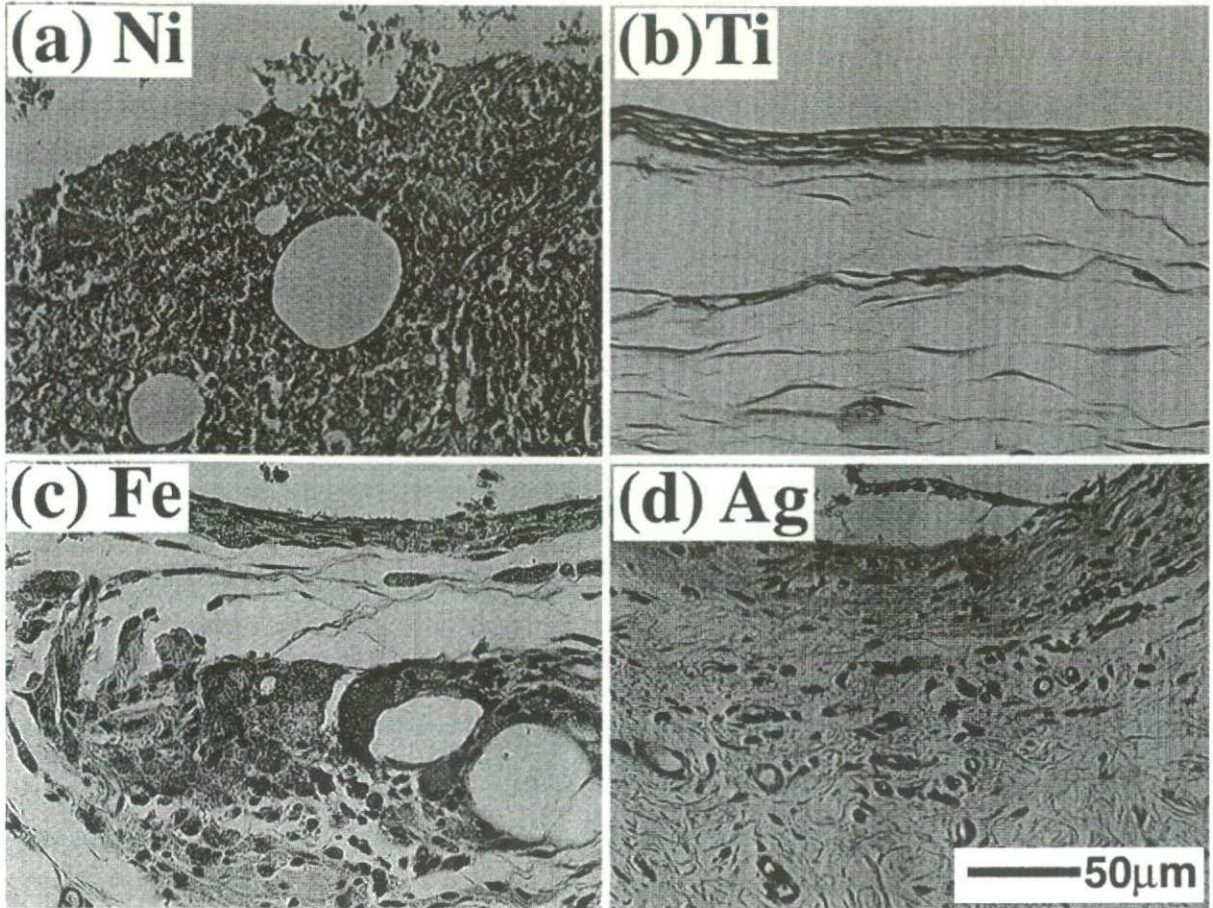


図2 各種金属に対する軟組織の反応(ラット皮下1週埋入後)(Watari F et al., 2004)⁵⁾

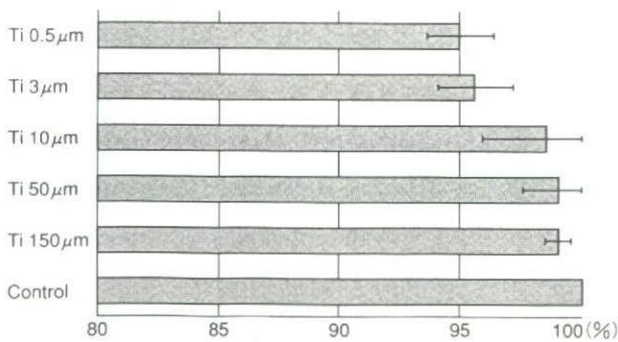


図3 細胞生存率のTi微粒子サイズ依存性 (Tamura K et al., 2002)⁶⁾

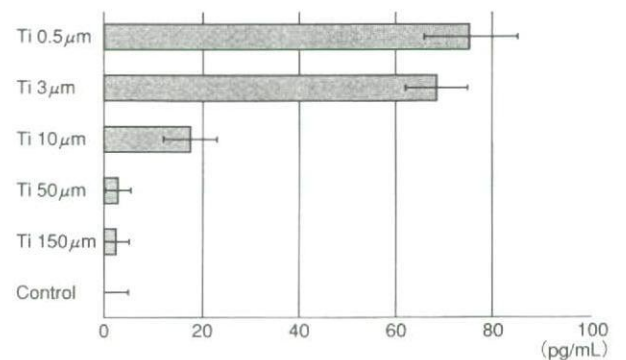


図4 ヒト好中球からのサイトカインIL-1β産生のTi微粒子サイズ依存性(Tamura K et al., 2002)⁶⁾

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することがわかる。

図4はヒト好中球からのサイトカインIL-1βの放出を示したものである。サイトカインは細胞から放出される比較的分子量の蛋白質で、細胞間のシグナル伝達、新たな細胞の分化・誘導など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-1β

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。Ti微粒子サイズが減少するとともに、放出量は10µm付近から急激に増加しており、細胞刺激性を示すことがわかる⁶⁾。

これらの液中での好中球の形態を観察すると、3µm以下の粒子でのみ好中球による貪食像が観察さ

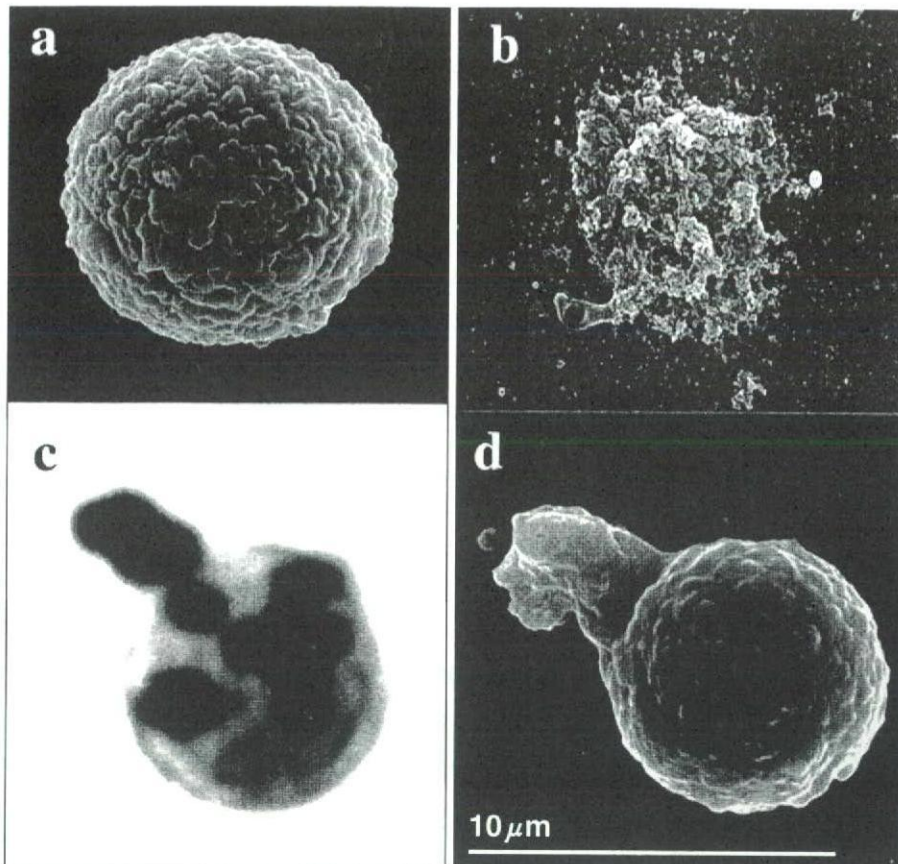


図5
各種微粒子に対するヒト好中球の反応
(Tamura K et al., 2002)⁶⁾
a : コントロール (SEM 像)
b : Ni (0.5 μm) (SEM 像)
c : TiO₂ (0.3 μm) (光顕像)
d : Ti (0.5 μm) (SEM 像)

れた。まず図5aは、HBSS溶液中での通常の好中球のSEM像(コントロール)である。そして図5c, dは、0.3 μm TiO₂, 0.5 μm Ti 粒子混和液中で観察された、好中球が偽足を伸ばし貪食しようとしている様子を捉えた光学顕微鏡像とSEM像である⁶⁾。この好中球をEDS (energy-dispersive spectrometer) 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5b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。好中球の大きさは約5～10 μm であり、3 μm 粒子は貪食可能であるが、10 μm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。

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。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・

形状に由来するものであることがわかる⁷⁾。また、このような現象は、溶解度などの化学的性質は異なるが、図2のように比較的良好な生体適合性を示すFeでも同様にみられる。すなわち、Ti, Feなどの金属、TiO₂, カーボンナノチューブなどのセラミックス、ポリ乳酸など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こる効果である。

さて、bioactive, bioinert 材料の *in vitro* 細胞毒性試験における、こうした微粒子に起因する毒性は、endotoxinなどの細菌内毒素にくらべれば、絶対値が1/1,000～1/1万以下とはるかに小さく⁸⁾、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* 組織埋入試験ではこのとき、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ことが観察される。こうした微粒子が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

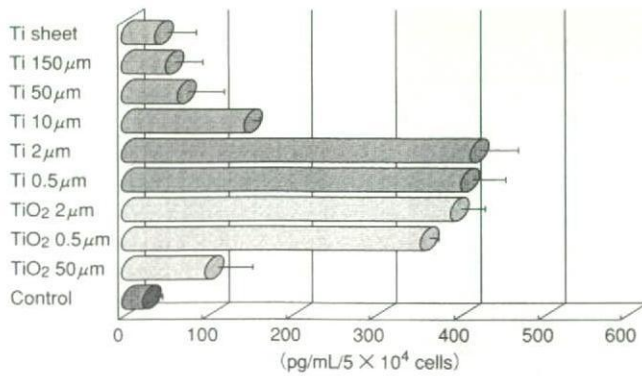


図6 ヒト好中球からのサイトカインTNF- α 産生の微粒子サイズ依存性(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾



図8 0.5 μ m Niをラット皮下に1年埋入後の腫瘍生成(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾

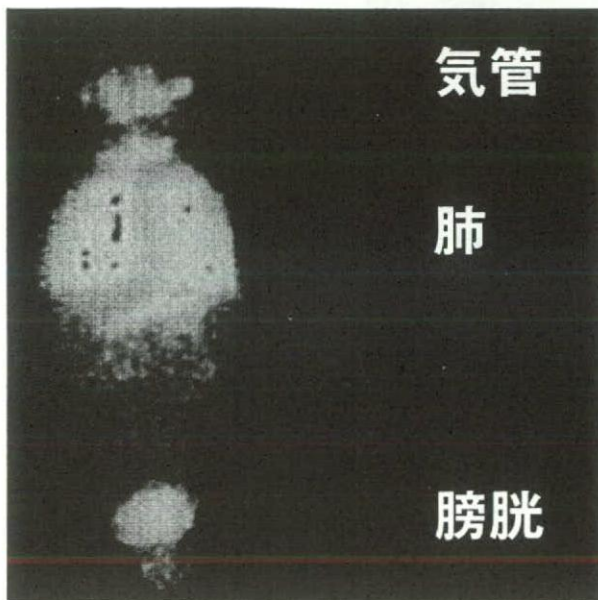


図7 ナノトキシコロジー：30nm TiO₂粒子の強制曝露試験後のXSAMマッピングによるラット体内の全身Ti元素分布像(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾

ナノパーティクルは呼吸器系を通じて体内に取り込まれ、全身に拡散する。

に至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。一方、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、後述のNi微粒子のように為害性は著しく強くなる。

微粒子がサブミクロンよりもさらに小さくなったときの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を図6に示す。TNF- α も代表的な炎症性サイトカインの一種で、特に細胞の貪食作用に密接に関連している。金属Tiは0.5 μ m以下になると容易に酸化し、微粒子として大気中下で扱

のは困難で、さらに小さいものにはTiO₂を用いている。物理的サイズ効果の材料非依存性を反映し、その絶対値レベルは金属Tiとあまり変わらない。刺激性はマイクロメートル前後～0.5 μ m付近を頂点として200 nm付近以下になるとむしろ低下し、50 nm TiO₂ではかなり低いレベルになる。また、長さを含めたカーボンナノチューブを用いて*in vivo*埋入試験を行うと⁹⁾、1 μ mや600 nmよりも、長さの短い200 nmのほうが早く貪食され、細胞内のライソゾームに取り込まれ、起炎性も低いことが観察される¹⁰⁾。

ナノトキシコロジー

微粒子になり、材料のサイズが細胞と同程度(約10 μ m)になると刺激性が昂進し、Tiのような生体親和性材料でも炎症を誘発するが、さらに小さくなると、むしろ刺激性は低下する。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みえる。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、異物の侵入を許してしまうということにも通ずる。

図7は30 nm TiO₂粒子のラットへの強制曝露試験後の体内全身のX線走査型分析顕微鏡(XSAM)^{11)~14)}によるTi元素マッピング像である。化粧品に使われている30 nmのTiO₂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、肺から血中に取り込まれ、全身に拡散していることがわかる。微粒子材質、大きさに

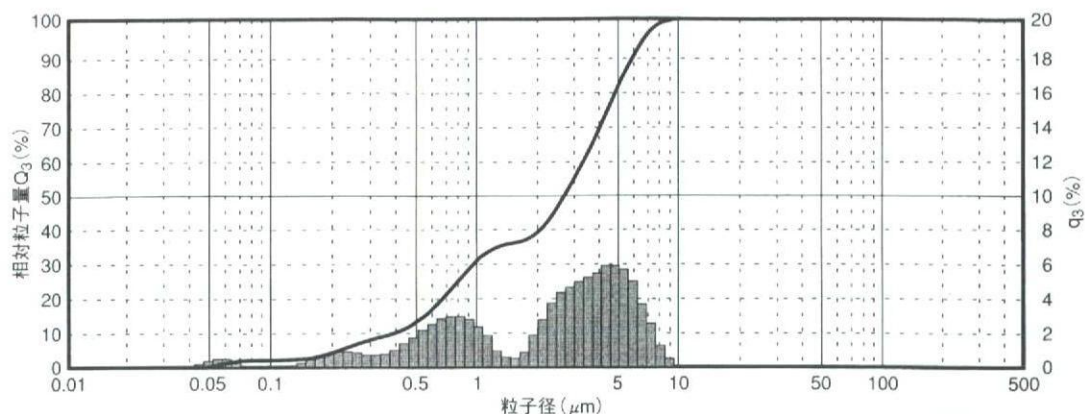


図9 摩耗粉の粒度分布(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾
Tiを歯科用エアタービンで研磨した一例

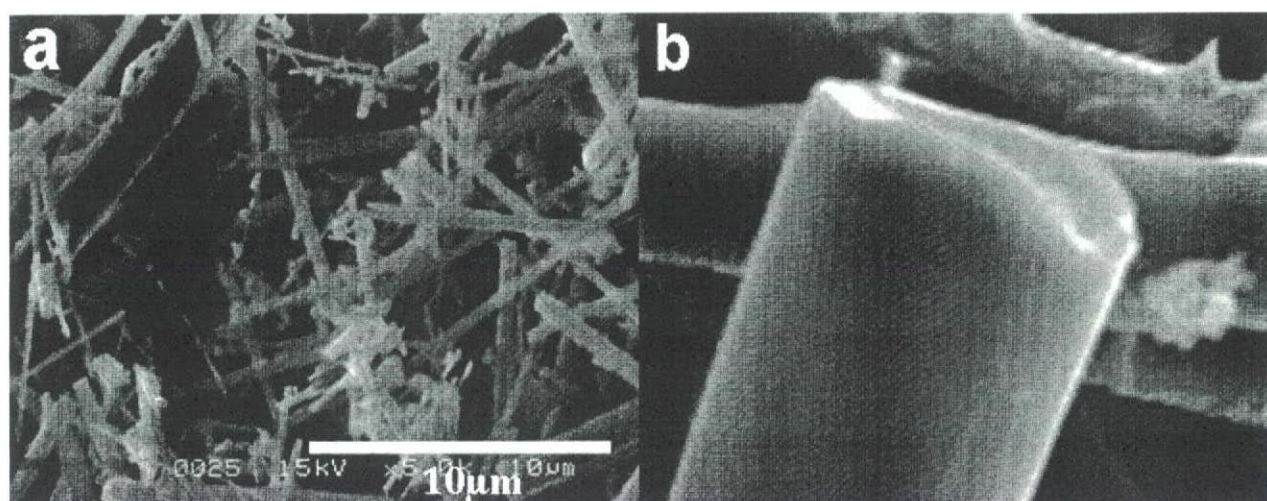


図10 アスベスト(クロシドライト)(a)とアスベスト代替品(b)のSEM像

よって細胞死を導きその場に蓄積するものと、血流によって他臓器に到達蓄積するものがある。これらは意図せずして血中を回流する効果である。

図8は0.5 μm Niをラット皮下に1年埋入後の結果で、腫瘍が生成している。本来、マクロでアレルギー性などの為害性を示すNiは、ミクロ/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した。これは、同一重量でも微粒子になると著しく表面積が増大する比表面積効果の一例である。

図9は摩耗粉の粒度分布の一例で、Tiを歯科用エアタービンで研磨したときの粒度分布である。最も大きな分布ピークが5 μm付近に、ついで0.8 μm、さらに低くなって0.2 μm、0.07 μm付近とつづいており、上述のようにいずれも生体組織との反応が生

起しうる範囲にあり、こうした観点からはやや微妙なサイズである。

形状効果—アスベスト

アスベストの発がん性はよく知られているが、アスベスト自体は粘土鉱物の一種であって材質に為害性があるわけではない。粉末形状が針状結晶であるために生ずる物理的微粒子為害性効果が第一の要因である。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、発がん性が高いクロシドライト、アモサイトでは図10, 11のように顕著な針状形状を示し、EDS元素分析を行うと通常のシリケー

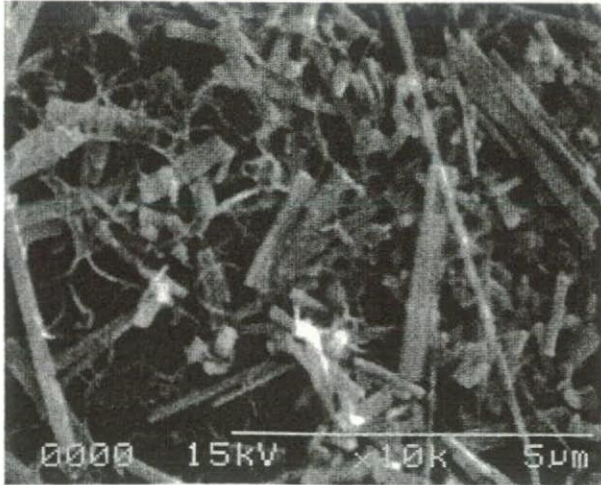


図11 アスベスト(クロシドライト)の分散性と
カーボンナノチューブの凝集性

トの成分のほかにも多量の Fe を特徴的に含有している。

クロシドライトとアスベスト代替品(アルミナ)を同倍率で比較したものを図 10 に示す。微粒子は約 10 μm 以下になると気管支を通過するが、代替品では大きさの点からも呼吸器系に侵入しにくい形態になっている。

アスベストとカーボンナノチューブ

カーボンナノチューブは主として電子エミッター、燃料電池など、電子、化学分野で注目されているが、バイオ応用に注目した研究はほとんどなされていない。欧米からは肺がん誘発性のあるアスベストとの形状の類似性による連想から、重大な為害性があるという論調が出されてきている¹⁵⁾。

図 11 はアスベスト(クロシドライト)とカーボンナノチューブを混合し水中攪拌後、乾燥した状態の SEM 像である。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着し飛散する。この図 11 は乾燥時に集積した部分で、針状のクロシドライトに細いカーボンナノチューブが絡まるように凝集している。カーボンナノチューブ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てほとんど湾曲することがないのに対し、屈曲性に富み、疎水性で凝集しやすいことがわかる。

筆者らは、カーボンナノチューブについても細胞機能性試験、動物埋入試験を行い、上述した bioinert 材料一般に起こ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為害性は認めず、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。バイオ用カーボンナノチューブの開発^{16~21)}、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などのバイオ応用、および有害汚染物質の吸着捕捉材^{22,23)}などの環境対策への応用開発を進めてきている²⁴⁾。

図 12 に人工体液に浸漬後、カーボンナノチューブ上に析出したアパタイトの SEM 像を示す²⁵⁾。針状または板状ナノアパタイト微結晶が、カーボンナノチューブを基点に放射状に成長している。溶液と基材の条件に依存して析出や結晶性、形態が変化する²⁶⁾。こうした現象は、アパタイトのいわゆるバイオミメティックコーティングとして、擬似体液に Ti を浸漬すると表面にリン酸カルシウムが析出することが知られているが、カーボンナノチューブでもアパタイトによる表面修飾が可能であった。

図 13 はヒト歯牙をリン酸でエッチングしたあとの象牙質で、脱灰^{27,28)}により残留したコラーゲン繊維が象牙細管内を含め一面にみられ、その上にカーボンナノチューブが吸着している様子が観察される。疎水性のカーボンナノチューブはコラーゲンに吸着しやすい特性を示す^{29,30)}。

図 14 は骨芽細胞様細胞 Saos2 を培養したときの細胞末端の SEM 像で、スカフォールドとしてポリカーボネート膜(図 14a)、カーボンナノチューブ(図 14b)を用いた場合を比較したものである。カーボンナノチューブ上で培養細胞は高い増殖・伸展性を示し、末端から多数の微細な細胞突起を遠方にまで張り出し強く付着する。同素体であるグラファイトでは細胞がきわめて付着しにくく、その血球に対する抗血栓性を活かして人工心臓弁材料として使用されているが、カーボンナノチューブ上では細胞はきわめて高い接着性と良好な増殖性を示す。

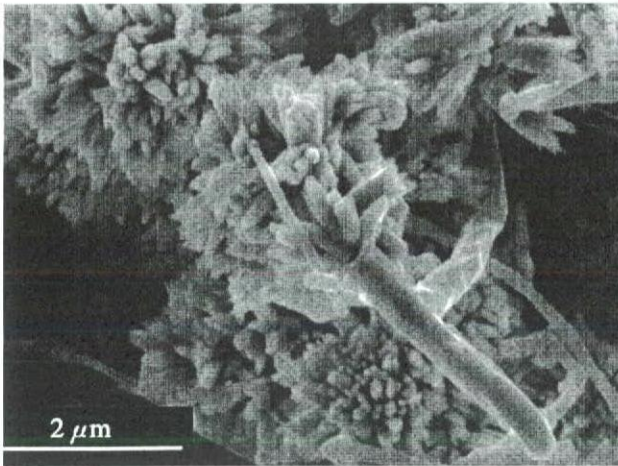


図12 人工体液中でカーボンナノチューブ上に析出したアパタイト(Akasaka T et al., 2005²⁵⁾; Akasaka T et al., 2005²⁶⁾)

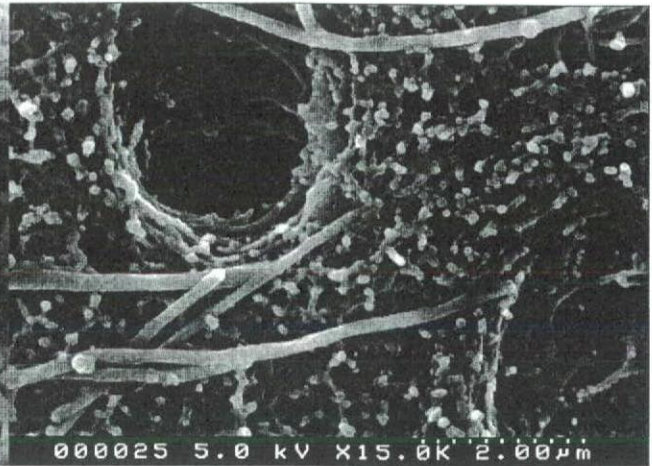


図13 脱灰象牙質表面のコラーゲン線維に吸着するカーボンナノチューブ(巨理文夫・編, 2005)²⁴⁾

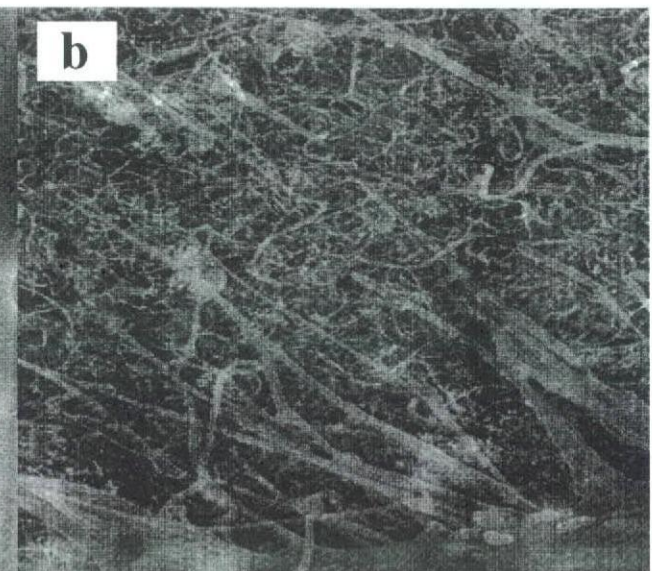
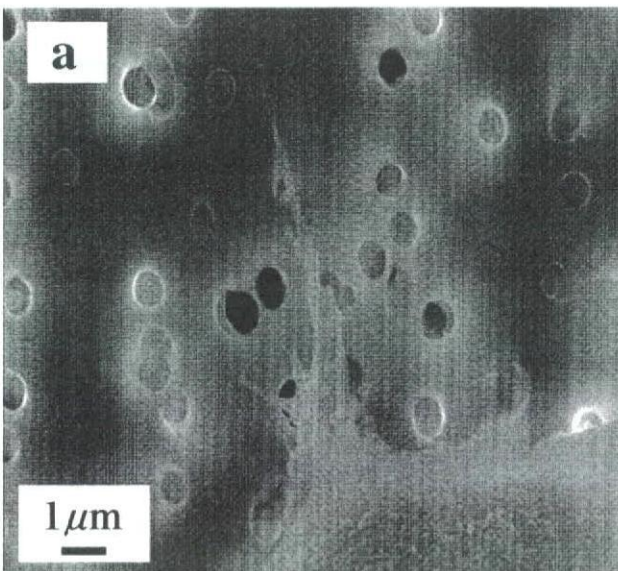


図14 ポリカーボネート膜(a)、カーボンナノチューブ(b)の各スカフォールド上で培養した細胞末端のSEM像(Aoki N et al., 2006²⁹⁾; Aoki N et al., 2005³⁰⁾)
カーボンナノチューブ上で培養細胞は高い増殖・伸展性を示し、末端から多数の細胞突起を張り出し強く付着する。

ナノアパタイトの機能性転換

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ことから、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。しかし、50 nm以下のナノ微粒子になると生分解性に変化し、生体に吸収されつつ骨再生を促す骨置換性に機能性が転換

し、新たな機能を発現する。

図15はナノアパタイト-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³¹⁾。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、協働的に作用しながら、ナノコンポジットの食食と新生骨形成がともに進行している。そして、吸収されつつある材料と新たに形成された骨が不可分的に存在する状態になっており、結果として、ナノアパ

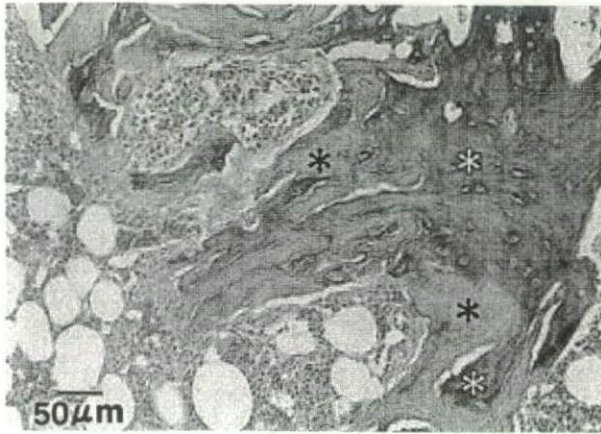


図15 ナノアパタイト-コラーゲンコンポジットの骨置換性(Yokoyama A et al., 2005)³¹⁾
 ナノコンポジット部(黒*)の吸収と新生骨形成(白*)が不可分に生じ、結果として骨置換性が達成されている。

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あいまって骨置換がさらに容易に進行する³²⁾。このような現象は、生体反応性に対する微粒子サイズ依存性とそのメカニズムを把握していると、よく理解できる。

結 言

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。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ことになる。たとえば、図8のNiの為害性昂進など、イオン溶出が関連する効果はこれに該当するだろう。また、②表面原子の占める割合が無視しえなくなり物性が変化する、さらに、1 nm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、材料特性の変化もある。また、③ある種の触媒にみられるような特異な活性点形成による反応活性化もこれに含まれるだろう。

しかし、生体反応性に及ぼす影響はそれに留まらない。こうした材料自体に由来する効果のみならず、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のである。④サイズ効果、⑤形状効果などがこれに当たる。これらは化学的性質に基づく

材質に由来する効果、すなわち、材料の特性とは独立にあらわれる物理的効果である。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と、マイクロ/ナノサイジングしても多くの場合、材料はイオン溶出性であり、比表面積効果が大きいために、この効果は認識しにくいことが多い。たとえば、Ni微粒子も図4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効果は弱いのか、ほとんど無視しうるために、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効果が単独で作用し、純粋なサイズ効果が顕現化することになる。

In vitro, in vivo 試験の結果を総合すると、およそ100 μm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 μm以下では刺激性が昂進し、特に10 μm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な材料に同様に認められ、材料に非特異的に起こる効果である。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ものである。すなわち、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、マイクロ～ナノになると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、その為害性の程度は*in vitro* 試験によれば細菌内毒素にくらべると1/1,000～1/1万以下と低く、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。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る。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至るアスベスト禍のような効果も可能性として考えられる。カーボンナノチューブは、その形態、動態、挙動がアスベストとはやや異なると考えられる。

また、図7の30 nmのTiO₂の強制曝露試験のように、微粒子サイズが50 nm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り込まれ全身に拡散し、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。

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まったく同じである。すなわち、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、意図せずして為害性に働くナノトキシコロジーとしてあらわれたとしても現象の本質は同じであり、けっして不思議ではない。

閑話休題、ナノトキシコロジーという用語はナノテクノロジーに対応し、わかりやすい。しかし、微粒子に特有な生体反応特性はマイクロメートル付近から開始し、さらに長期的な組織埋入試験では100 μm付近からあらわれる。人為的な単位に合わせたこの用語は生体に由来する現象の本質に即したのではなく、この意味で、微粒子特有の効果という観点からは必ずしも正確ではない。

筆者らは2000年以来、世界に先駆けて研究を進め、2004年のナノトキシコロジーという用語の出現、2005年のアスベスト問題の再燃以前から、ナノテクノロジーのバイオ応用、とりわけ人体へのバイオ応用には予め生体反応性を調べ、ナノトキシコロジー/安全性条件³⁾を把握したうえで、その指針のもとに推進すべきであると繰り返し提起してきたが、必ずしも認知されていない。その大きな理由の一つに、材料と生体の両者に精通していることが必要ということがある。材料あるいは医学・生物学の専門家の一方のみの視点からではその意義が充分理解されずに終わることが多い。また、ナノテクノロジーの発展に有害と捉えられる傾向もある。

しかし、日本がこの問題の意義を理解せず忌避している間に、必ずしもデータが出て先行しているわけではない欧米が積極的に、世界標準やナノテクノロジーの規制といった観点から国際的な枠組みをまず構築し、ヘゲモニーを握りつつあり、日本は後発的に参加し後塵を拝する結果になろうとしている。

日本の科学の展開に典型的な推移である。ナノテクノロジーの安全性/危険性評価に関する研究会では国内外ともデータに基づかないままに論じられたり、誇張して取り上げられたりすることが多い。また、各材料について安全/危険と一面的に断定されることも多いが、マクロのときは異なり、ナノ微粒子の場合は高機能性と刺激性の両面を併せ持つのであり、条件とコントロールしだいでどちらかの面が強くと理解したほうがよい。

生体反応性への材料のナノサイジング効果の解明と制御はナノテクノロジーの進展にとって、材料学的にも医学的見地からも新たな、大きな発展につながる、本質的、かつ未知であるが、それだけに魅力的な学問分野である。また、人間の健康と環境に影響を及ぼす問題でもある。今後の新たな知見と開拓が期待される。

本稿の研究結果の一部は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、ナノメディシン分野(H14-ナノ-021)、および化学物質リスク研究事業(H18-化学-一般-006)の助成を得て行われた。

文 献

- 1) Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T : Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials* 2001, 22 : 1253-1262.
- 2) Uo M, Asakura K, Yokoyama A, Tamura K, Totsuka Y et al. : Analysis of titanium dental implants surrounding soft tissue using X-ray absorption fine structure (XAFS) analysis. *Chemistry Letters* 2005, 34 : 776-777.
- 3) Tamura Y, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T : Mechanical properties of surface-nitrided titanium for abrasion resistant implant materials. *Materials Transactions* 2002, 43 : 3043-3051.
- 4) Tamura Y, Yokoyama A, Watari F, Kawasaki T : Surface properties and biocompatibility of nitrided titanium for abrasion resistant implant materials. *Dent Mat J* 2002, 21 : 355-372.
- 5) Watari F, Yokoyama A, Omori M, Hirai T, Kondo H et al. : Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for bio-medical application. *Composites Science and Technology* 2004, 64 : 893-908.
- 6) Tamura K, Takashi N, Kumazawa R, Watari F, Totsuka Y : Effects of particle size on cell function and morphology in titanium and nickel. *Materials Transactions* 2002, 43 : 3052-3057.
- 7) Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M, Totsuka Y : Effects of Ti ions and particles on cellular function and morphology of neutrophils. *Biomaterials* 2002, 23 : 3757-3764.
- 8) Kiura K, Sato Y, Yasuda M, Fugetsu B, Watari F et al. : Activation of human monocytes and mouse splenocytes by single-walled carbon nanotubes. *J Biomed Nanotechnology* 2005, 1 : 359-364.
- 9) Yokoyama A, Sato Y, Nodasaka Y, Yamamoto S, Kawasaki T et

- al. : Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats. *Nano Letters* 2005, 5 : 157-161.
- 10) Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, Akimoto Y, Ogino S et al. : 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* 2005, 1 : 176-182.
 - 11) Uo M, Watari F, Yokoyama A, Matsuno H, Kawasaki T : Tissue reaction around metal implants observed by X-ray scanning analytical microscopy. *Biomaterials* 2001, 21 : 677-685.
 - 12) Uo M, Watari F, Yokoyama A, Matsuno H, Kawasaki T : Visualization and detectability of rarely contained elements in soft tissue by X-ray scanning analytical microscopy and electron probe micro analysis. *Biomaterials* 2001, 22 : 1787-1794.
 - 13) Uo M, Watari F, Yokoyama A, Matsuno H, Kawasaki T : Dissolution of nickel and tissue response observed by X-ray analytical microscopy. *Biomaterials* 1999, 20 : 747-755.
 - 14) Uo M, Asakura K, Kohgo T, Watari F : Selenium distribution in human soft tissue determined by using X-ray scanning analytical microscope and X-ray absorption fine structure analysis. *Chemistry Letters* 2006, 35 : 66-67.
 - 15) 松田正己 : ナノテクノロジー戦略に及ぼすアスベスト問題の影響—その理由と動向, 欧米の場合—. *現代化学* 2005, 417 : 14-16.
 - 16) Sato Y, Shibata K, Kataoka H, Ogino S, Fugetsu B et al. : Strict preparation and evaluation of water-soluble hat-stacked carbon nanofibers for biomedical application and their high biocompatibility : influence of nanofiber-surface functional groups on cytotoxicity. *Molecular BioSystems* 2005, 1 : 142-145.
 - 17) Rosca ID, Watari F, Uo M, Akasaka T : Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon* 2005, 43 : 3124-3131.
 - 18) Wang W, Omori M, Watari F, Yokoyama A : Novel bulk carbon materials for implant by spark plasma sintering : *Dent Mat J* 2005, 24 : 478-486.
 - 19) Ushiro M, Uno K, Fujikawa T, Sato Y, Tohji K et al. : X-ray absorption fine structure (XAFS) analyses of Ni species trapped in graphene sheet of carbon nanofibers. *Physical Review B* 2006, 73 : 144103/1-11.
 - 20) Asakura K, Chun WJ, Tohji K, Sato Y, Watari F : X-ray absorption fine structure studies on the local structures of Ni impurities in a carbon nanotube. *Chemistry Letters* 2005, 34 : 382-383.
 - 21) Uo M, Tamura K, Sato Y, Yokoyama A, Watari F : The cytotoxicity of metal-encapsulating carbon nanocapsules. *Small* 2005, 1 : 816-819.
 - 22) Fugetsu B, Satoh S, Shiba T, Mizutani T, Lin Y et al. : Caged multi-walled carbon nanotubes as the adsorbents for affinity-based elimination of ionic dyes. *Environmental Science & Technology* 2004, 38 : 6890-6896.
 - 23) Fugetsu B, Satoh S, Iles A, Tanaka K, Nishi N, Watari F : Encapsulation of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in Ba₂-alginate to form coated micro-beads and their application to the pre-concentration/elimination of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl from contaminated water. *The Analyst (London)* 2004, 129 : 565-566.
 - 24) 亙理文夫・編 : 厚生労働科学研究補助金, 萌芽の先端医療技術推進研究事業, ナノメディシン分野. 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 (課題番号 : H14-ナノ-021), 平成14~16年度総合研究報告書2005, p1-377 ; 同平成16/15/14年度, 総括・分担研究報告書. 一各年度毎—(平成16年度)2005, p1-227 ; (平成15年度)2004, p1-262 ; (平成14年度)2003, p1-168.
 - 25) Akasaka T, Watari F : Nano-architecture on carbon nanotube surface by biomimetic coating. *Chemistry Letters* 2005, 34 : 826-827.
 - 26) Akasaka T, Watari F, Sato Y, Tohji K : Apatite formation on carbon nanotubes. *Material science & Engineering C* 2005, 26 : 675-678.
 - 27) Watari F : *In situ* quantitative analysis of etching process of human teeth by atomic force microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 2005, 54 : 299-308.
 - 28) 亙理文夫 : 「見る」にこだわる—歯科医学研究への各種顕微鏡の応用展開—, *日本歯科医師会雑誌* 1999, 51 : 1199-1208.
 - 29) Aoki N, Yokoyama A, Nodasaka Y, Akasaka T, Uo M et al. : Strikingly extended morphology of cells grown on carbon nanotubes. *Chemistry Letters* 2006, 35 : 508-509.
 - 30) Aoki N, Yokoyama A, Nodasaka Y, Akasaka T, Uo M et al. : Cell culture on a carbon nanotube scaffold. *J Biomed Nanotechnology* 2005, 1 : 402-405.
 - 31) Yokoyama A, Gelinsky M, Kawasaki T, Kohgo T, Konig U et al. : Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen- an animal study. *J Biomed Mater Res Part B : Appl Biomater* 2005, 75B : 464-472.
 - 32) Liao S, Wang W, Uo M, Ohkawa S, Akasaka T et al. : A three-layered nano-carbonated hydroxy apatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 2005, 26 : 7564-7571.
 - 33) 熊澤龍一郎, 亙理文夫, 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* 2001, 20 : 356-365.
 - 34) 亙理文夫・編 : 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. 第1回研究会抄録集, 2005, p1-35 ; 第2回研究会抄録集, 2006, p1-45.

Internal distribution of several inorganic microparticles in mice

Shigeaki Abe^{1,*}, Chika Koyama², Tsukasa Akasaka¹, Motohiro Uo¹, Yoshinori Kuboki^{2,3} and Fumio Watari¹

¹Department of Biomedical Materials and Engineering, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, North 13, West 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

²School of Dental Medicine, Hokkaido University, North 13, West 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

³Koken Bioscience Institute, 2-13-10 Ukima, Kita-ku, Tokyo 115-0051, Japan

*sabe@den.hokudai.ac.jp

Keywords: biodistribution, microparticle, visualization, X-ray scanning analytical microscopy

Abstract.

Internal distributions of several inorganic microparticles administered into the tail vein of mice were determined using a Scanning X-ray analytical microscopy and energy-dispersed X-ray spectroscopy. After administration through the tail vein of mice, the particles circulated by blood flow then reach some organs and temporally remained. In this study, we determined that the distribution behaviors in body depend upon the chemical species and the size.

Introduction

Recently, micro- / nano-sized inorganic- materials have received much attention in view of biocompatibility and / or nanotoxicity because of developments in nanotechnology. When the size of particles reaches the micro/nano level, some of them have shown toxicity *in vitro* even they are considered biocompatible at the macro level [1-5]. In previous study, we determined that even biocompatible materials such as Ti and TiO₂ cause inflammation with the decrease of particle size [5]. To investigate the compatibility, it is important to determine the internal distribution of the materials in body. Some investigators have reported the biodistribution of micro- / nano- particles. Moritake et al. reported *in vivo* delivery of nano-magnetic particles by external magnetic field [6]. Ballou et al. determined and visualized surface modified Quantum dots by their strong emission [7]. However, the distributions of other biocompatible materials particles are still unknown. In addition, the method for distribution analysis without labeling is able to avoid the effect of labeling to distribution. Recently, we determined the biodistribution of Pt and TiO₂ microparticles in mice using X-ray scanning analytical microscopy [8]. This method required no labeled or treatment of target particles. Then, it would be one of the useful methods of the study of biodistribution of micro/nano particle. In the study, Pt microparticles, which have a diameter of 1 μm, quickly circulated in body after injection, then condensed in the spleen. This tendency is in good agreement to typical small molecules. On the other hands, TiO₂ particles (φ = 1 μm) were trapped in the lung temporally then remained for a week. In this paper, we described the results of determination that the distribution of several administered inorganic particles in mice using an X-ray scanning analytical microscope and energy-dispersed X-ray spectroscopy.

Materials and Methods

Male mice (Jcl:ICR) were used at ages from 8 to 12 weeks. Several sizes of inorganic particles were obtained. Some of metal microparticles (Fe, Ni, Ti, W etc.) have a diameter less than 10 μm. Pt and TiO₂ (**a**) have a diameter of 1 μm. Fe₂O₃, TiO₂ (**b**) and TiC have a diameter of 0.5 μm. These

particles dispersed into normal saline, respectively. The concentration was adjusted to 10 mg/mL. 0.6 mL of the dispersion was injected into the tail veins of mice. Their organs were excised at several post injection time (from 0 hr. to 2 weeks). The specimens of excised organs were subjected to elemental distribution analysis using X-ray scanning analytical microscope (XGT-2000V, Horiba, Kyoto, Japan). The XSAM observation was carried with the incident X-rays generated from an Rh anode under conditions of 30kV and 1 mA [9-12]. The elemental distribution images in these specimens were also observed by energy-dispersed X-ray spectrometry (EDS) (Genesis, EDAX Japan, Tokyo, Japan). In order to evaluate the concentration of microparticles in the organs, a part of each organ was calcined at 800 °C for 2 hours in air and dissolved in nitrohydro chloric acid (for Pt) or conc. HCl aq. (for TiO₂). The concentrations in the solutions were quantitated with inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy (ICP-AES P-4010, Hitachi, Tokyo, Japan) and the concentrations in each organ were estimated. All operations on animals were in accord with institutional animal use and care regulations of Hokkaido University.

Results and Discussions

Transmission X-ray and the elemental distribution images (Ti) of administered titanium oxide ($\phi = 1\mu\text{m}$) of a whole mouse were determined with XSAM (Figure 1). Fluorescence X-ray from Ti in the lung and liver was observed. The fluorescence X-ray in the lung was observed for a couple of days then disappeared, then the fluorescence in the liver was increased with the time. In contrast, fluorescence X-ray from Fe in the lung was observed only in the initial period by Fe₂O₃ particles injection. The fluorescence quickly decreased with post-injection time, and then disappeared after one day. It was suggested that the Fe₂O₃ particles left from lung quickly by blood circulation then arrived at liver. This phenomenon was similar to a typical small molecule. Therefore, the administered particles would be trapped in small tissue such as alveolus, sinusoidal capillary or splenic sinus in organs. In longer time-scale, the total amount of administered particles were decreased with post-injection time. Then, the administered particles were considered to be excreted. Our recent work that the concentration of administered Pt microparticles in mice was estimated with ICP-AES analysis was also suggested the assumption [8].

To determine the details of the distribution in the organs, specimens of the lung administered TiO₂ particles were prepared then observed by EDS. As shown in Figure 2, the administered TiO₂ particles were localized in the lung. They would distribute along the lung tissue. In other organs, no graphical patterned distribution, such as Figure 2b, were observed. However, the distribution as a un-natural dotted manner was observed in some organs.

To confirm the difference of depended upon the

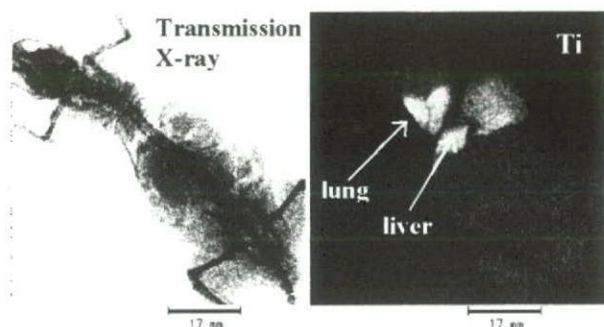


Figure 1. Elemental distribution images (Ti) of mice that was administered TiO₂ (1) particles at 1 day post-injection.



Figure 2. SEM (a) and EDS (b) images (Ti) in the lung of mice that was administered TiO₂ (1) particles at 1 day post-injection.

chemical species, several inorganic microparticles were administered into mice. The specimens that were excised from the mice's organs (lung, liver, kidney and spleen) after microparticles injection were observed with XSAM. The distributions of administered particles in body at 1 day post-injection were determined as shown in Figure 3. The distribution in body varied with the materials. In addition, the distribution changed when the size of particle was different. The result suggests that the biodistribution depends upon not only the materials but also the size of particles. According to our previous study, the distribution is in good agreement with the relative concentration of injected particles in the organs. The distribution of inorganic microparticles in body was briefly distinguished into 2 types. One is condensed in the lung, another is condensed in the spleen. Now, we do not arrive at the clear mechanism, however, some of the particles show a time-dependence of the biodistribution. For example, TiO_2 and Pt microparticles, which have a diameter of $1\ \mu\text{m}$, show clearly different time-dependence of the biodistribution [8]. The injected Pt particles reach the lung first, then move to other organs rapidly. On the other hand, TiO_2 particles are temporarily trapped in the lung and remain for a week. This result suggests that the administered inorganic microparticles have different distributions in the body depending upon the elements, even if they have the same diameter. Therefore, it is important to investigate the biodistribution of several materials in the body.

These results suggest that each administered material has its own individual distribution property and some of them showed time-dependence. In addition, it was suggested that the distribution of particles depends on the particle size.

Summary

In this study, we succeeded in visualizing the biodistribution of inorganic microparticles in mice. The difference between chemical species and the effect of particle size on the distribution were determined. We also succeeded in observing the localized unique distribution in the tissue using an energy-dispersed X-ray spectroscopy.

Acknowledgment

This work was supported by Grant-in-aid for Research on Chemical Substance Assessment from Health and Labor Science Research Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan (H18-Chemistry-General-006) and Grant-in-Aid for Young Scientists (B) No. 19791419 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

References

- [1] J. Veranth, E. Kaser, M. Veranth, M. Koch, G. Yost, *Particle Fibre Toxicol.*, 4, 1 (2007).
- [2] J. C. Carrero-Sanchez, A. L. Elias, R. Mancilla, G. Arrellin, H. Terrones, J. P. Laclette and M. Terrones, *Nano Lett.*, 6, 1609 (2006).
- [3] S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltész, A. M. Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi and J. V. Frangionor, *Nature Biotech.*, 22, 93 (2004).

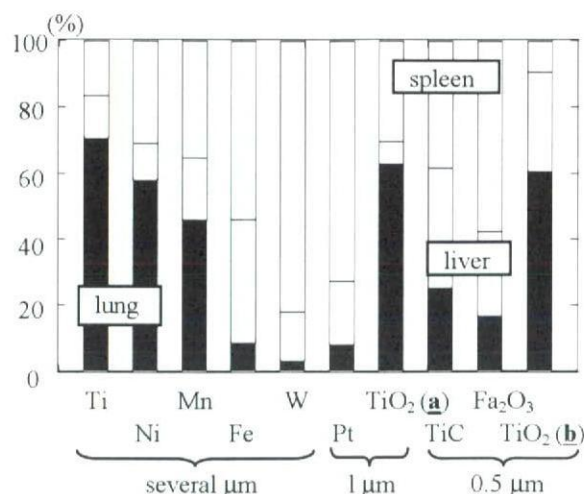


Figure 3. Relative concentration of administered several inorganic microparticles in the lung, liver and spleen of mice at 1 day post-injection.

- [4] C. Wilhelm, J. Fortin, and F. Gazeau, *J. Nanosci. Nanotech.*, 7, 2933 (2007).
- [5] F. Watari, Shigeaki Abe, Kazuchika Tamura, Motohiro Uo, Atsuro Yokoyama, and Yasunori Totsuka, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 116, 1-5 (2008)
- [6] S. Moritake, S. Taira, Y. Ichiyanagi, N. Morone, S. Song, T. Hatanaka, S. Yuasa and M. Setou, *J. Nanosci. Nanotech.*, 7, 937 (2007)
- [7] B. Ballou, B. C. Lagerholm, L. A. Ernst, M. P. Bruchez and A. S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.*, 15, 79 (2004)
- [8] S. Abe, C. Koyama, M. Uo, T. Akasaka, Y. Kuboki and F. Watari, *J. Nanosci. Nanotech.*, (submitted)
- [9] M. Uo, K. Asakura, A. Yokoyama, M. Ishikawa, K. Tamura, Y. Totsuka, T. Akasaka and F. Watari, *Dent. Mater. J.* 26, 268 (2007)
- [10] M. Uo, K. Asakura, T. Kohgo and F. Watari, *Chem. Lett.*, 35, 66 (2006)
- [11] M. Uo, M. Tanaka and F. Watari, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 4, 70B, 146 (2004)
- [12] M. Uo, F. Watari, A. Yokoyama, H. Matsuno and T. Kawasaki, *Biomaterials*, 22, 1787 (2001)

Physical: Full-length

High-resolution electron microscopy of multi-wall carbon nanotubes in the subcutaneous tissue of rats

Norihito Sakaguchi^{1,*}, Fumio Watari², Atsuro Yokoyama²
and Yoshinobu Nodasaka²

¹Center for Advanced Research of Energy Conversion Materials and ²Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita13, Nishi7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: sakagu@ufml.caret.hokudai.ac.jp

Abstract The atomic structure of multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) implanted in the subcutaneous tissue of rats was examined by means of high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM). Clusters of the MWCNTs implanted in the subcutaneous tissue were well recognized by the TEM observations. It was indicated that some nanotubes were taken in phagocytes after the 1-year implantation. The deterioration of crystalline structure of the nanotubes in phagocytes was shown by the HRTEM observation. It was suggested that the deterioration of the nanotubes was due to the peeling of the outer graphene layers in the phagocytes.

Keywords carbon nanotube, *in vivo*, high-resolution electron microscopy, low-voltage and high-voltage transmission electron microscope

Received 18 August 2008, accepted 20 August 2008

Introduction

The development of nanomaterials for drug delivery systems has attracted considerable attention because of the realization of health promotion and quality of life in the aged society of the 21st century. In particular, many researches for the application of biotechnology of carbon nanomaterials such as carbon nanotubes (CNTs) [1–6], carbon nanofibers (CNFs) [7,8] and fullerenes [9–14] have been extensively performed. Most these researches were due to the *in vitro* examination in the cell culture on scaffolds. Recently, toxicity of CNTs has been reported, and there are a lot of questions about their safety as the biomaterials [15–18]. Therefore, it is especially important to evaluate their toxicity and biocompatibility of the *in vivo* tissue reaction to these nanomaterials. However, there are only a few reports on the biological reaction to the nanoscale materials [19,20]. Yokoyama *et al.* [20] have clarified the tissue response to the CNFs implanted in the subcutaneous tissue of rats by means of transmission electron microscopy (TEM). They concluded that the CNFs in the subcutaneous tissue did not induce an acute severe inflammatory reaction. On the other hand, it was also indicated that the length of the CNFs reduced with time, and some of CNFs were translucent due to the delamination of the graphene layer. However, a deterioration mechanism

and an atomic structure of the carbon nanomaterials in the tissue have not been clarified yet. In this paper, we present electron microscopy results on the morphology and crystallography of CNTs implanted in the subcutaneous tissue of rats. High-resolution TEM (HRTEM) was used to investigate the detailed atomic structure of the CNTs in the tissue. The deterioration of the CNTs was also examined by the HRTEM observation.

Materials and methods

Purification, cutting and separation of MWCNTs

Multi-wall CNTs (MWCNT) of about 5 nm in diameter and 0.8 μm in length, synthesized by chemical vapor deposition (NanoLab, Inc., MA, USA.), were used throughout the experiments. The purity of the MWCNTs was 80 wt% with impurities such as amorphous carbon, Fe, Mo, Cr and Al. The diameter was in the range between 20 and 40 nm, and the length was in the range between 500 nm and 5.0 μm . After purification by the method described in a previous report [21], MWCNTs with 98 wt% pure were suspended in a 3:1 mixture of concentrated $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$, exposed to ultrasonic irradiation and filtered using polycarbonate membrane filters with respective cylindrical pore diameters of

2.0, 1.2, 0.8 and 0.4 μm . We used the filtered cake samples on 0.8- μm pore size membrane filters as testing samples.

Animal experiments

Incisions were made bilaterally in the thoracic region of six male 6-week-old Wistar strain rats under general anesthesia. Two pockets were made in the subcutaneous tissue. Clusters of MWCNTs were implanted in the subcutaneous tissue of each rat in the thoracic region bilaterally. Animal experiments were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine.

TEM specimen preparation

The rats were sacrificed at 1 week and 1 year after the surgery. Segments of the subcutaneous tissue including the MWCNTs were excised and fixed. TEM specimens were post-fixed with 1% OsO_4 and embedded in epoxy resin after dehydration. Ultrathin sections (80 nm approximately) were cut with a diamond knife and stained with uranyl acetate and lead citrate. Stained sections were placed on a supporting carbon mesh grid.

TEM observation

High-contrast observation of the subcutaneous tissue and the MWCNTs was carried out using a conventional 200 kV TEM (Hitachi H-700) operating at a voltage of 75 kV. A high-resolution high-voltage TEM (HRHVTEM, JEOL JEM-ARM-1300) was used for HRTEM observation of the MWCNTs in the tissue. The spherical and chromatic aberration coefficients of the objective lens of the HRHVTEM were 2.65 and 4.1 mm, respectively. The point-to-point resolution measured at a Scherzer defocus of -53 nm and an acceleration voltage of 1250 kV was 0.118 nm.

Results

Cell organelles of the stained ultrathin section of subcutaneous tissue of rats after MWCNTs' implantation at 1 week and 1 year are shown in Fig. 1. These observations were performed using a low-voltage TEM. Some clusters of MWCNTs were observed as black contrasts in intercellular space both at 1 week and 1 year after the implantation. The structure of large clusters of the MWCNTs unchanged between the 1-week and 1-year implantation, although the degree of aggregation of the clusters slightly decreased after the 1-year implantation. Each organelle was clearly seen in the figure, so severe inflammatory response such as necrosis might be very weak in both cases. The magnified TEM images of the MWCNTs implanted in the subcutaneous tissue at 1 week and at 1 year are shown in Fig. 2. Some nanotubes separated from the cluster of the MWCNTs after the implantation at 1 week. The separating nanotubes are not divided into

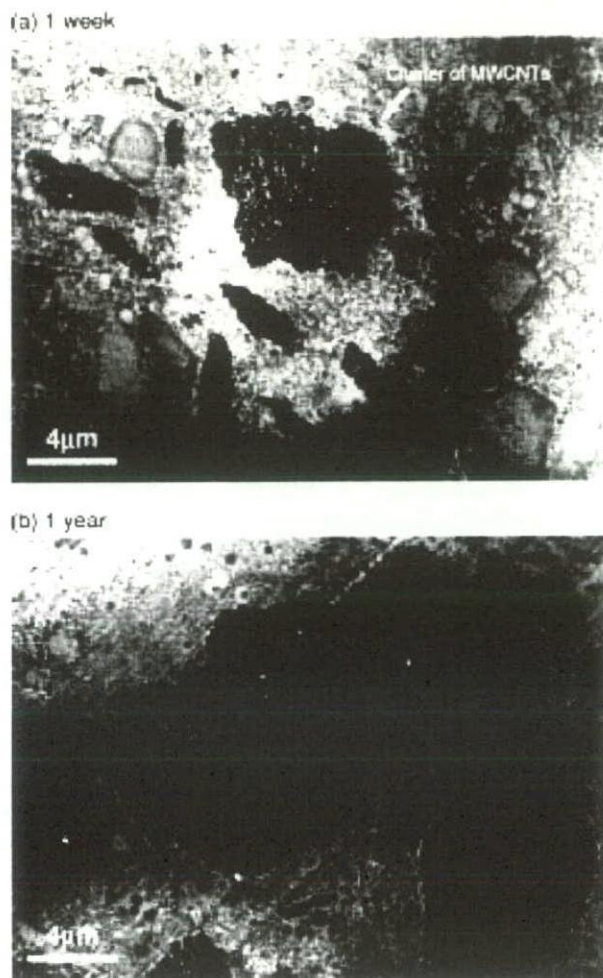


Fig. 1. Cell structures and clusters of MWCNTs implanted in the subcutaneous tissue of rat at (a) 1 week and (b) 1 year.

parts although they are slightly curved. At 1 year after the implantation, some of separating nanotubes were observed in phagocytes with a lot of vacuoles. The mean length of the MWCNTs covered by the lysosomal membranes looks shorter than that observed at a 1-week implantation sample although the characteristic form of the nanotubes was recognized.

To examine the detailed atomic structures of the MWCNTs in the tissue, the HRTEM observations were performed using a high-voltage TEM. Figure 3 shows a bright-field image and HRTEM images of the MWCNTs implanted in the subcutaneous tissue of rats at 1 week. Although the contrasts of the bright-field image on both the cell organelles and MWCNTs were weaker than those of Fig. 2, one can see the morphology and aggregation of individual nanotubes by using the HVTEM. Moreover, although the nanotubes were embedded in the subcutaneous tissue, the stacking of the graphene layers of each nanotube was clearly visible in the HRTEM image. Since the surrounding tissue causes the

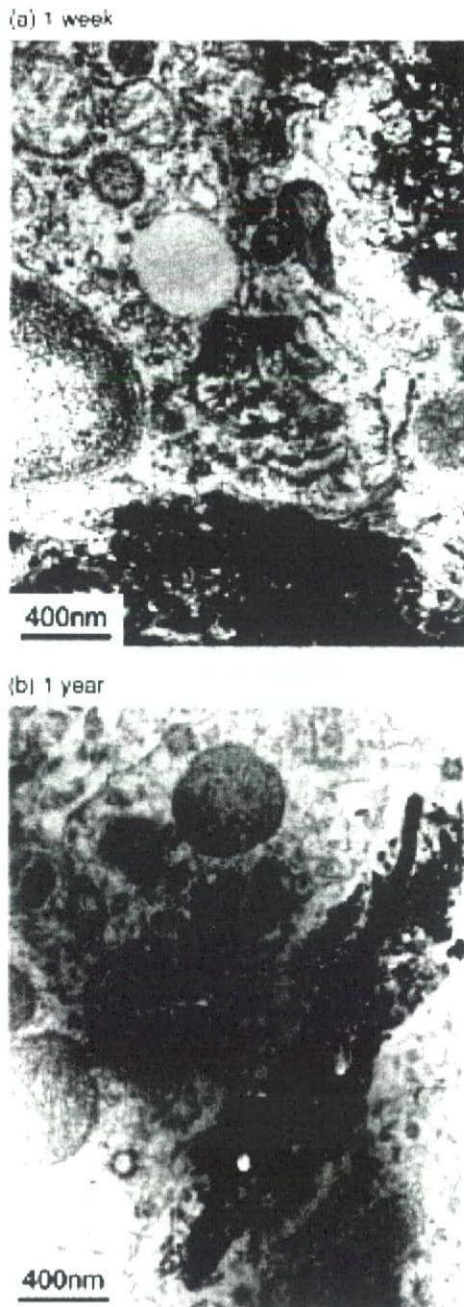


Fig. 2. TEM images of MWCNTs implanted in the subcutaneous tissue at (a) 1 week and (b) 1 year.

deterioration of the quality of the HRTEM image because of the scattering of electrons, this influence can be disregarded by the high-energy electrons due to their high transparency. The observed nanotubes are curved in some places but the layered structure of graphene is entirely kept around there. This implies that the MWCNT could exist in a stable form during the 1-week implantation in the subcutaneous tissue.

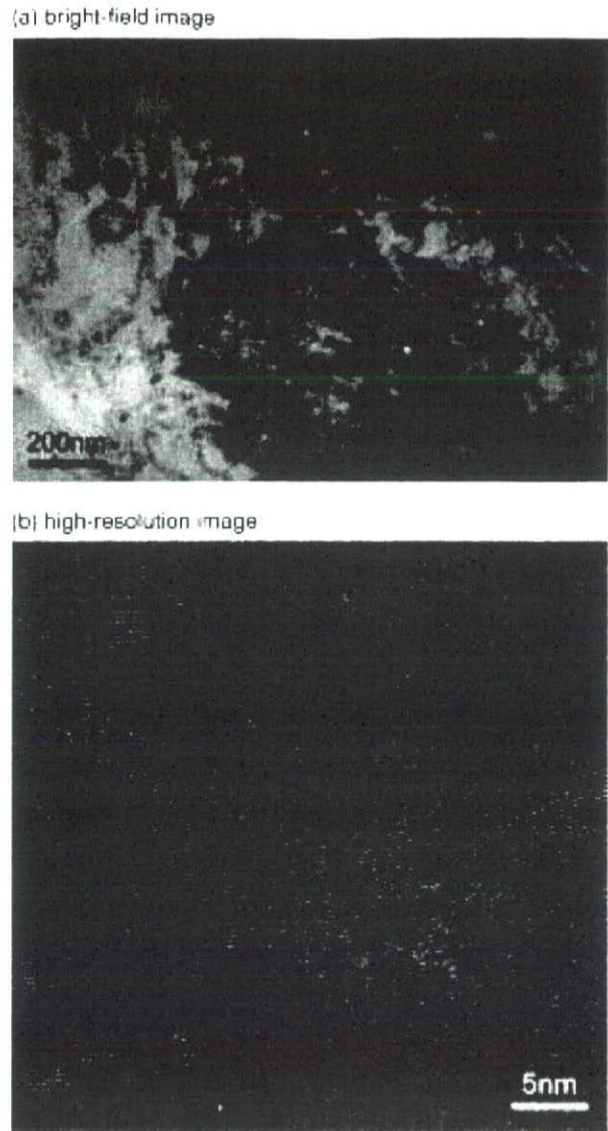


Fig. 3. (a) A bright-field image of MWCNTs implanted in the subcutaneous tissue of rat at 1 week and (b) the corresponding HRTEM images of the MWCNTs.

After 1 year from the implantation, some loose MWCNTs were observed in phagocytes. Figure 4 shows a bright-field image and HRTEM images of the MWCNTs implanted at 1 year. In the bright-field image, although the characteristic form of the MWCNTs was recognized, the contrast of each nanotube was weaker than that shown by the 1-week implantation. In other words, some nanotubes appeared translucent. The atomic structures of the MWCNTs slightly differed from the previously observed structure too. Although stacking of the graphene layers was recognized in the HRTEM image, the atomic structure of the nanotubes was slightly indistinct. In some places, the nanotube was disconnected and slightly waved. A typical HRTEM image