

質について多くの共通点のある、すなわち同じ特性のreferenceを求めてきたことである。そのようなreferenceは、現実には存在しない。Referenceが存在しなければ、いつまでたってもCNTsは生体材料に使えないことになってしまう。より大きな概念でとらえ、ナノサイズの粒子物質であれば、referenceの候補と考えるべきである。実際には、大きな体積をもつbulkの生体材料も、このような大きな概念でreferenceが定められている。例えばbulk materialsの細胞毒性試験で、抽出法におけるnegative reference materialは高密度ポリエチレンフィルムで、positive reference materialはZinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) 含有ポリウレタンフィルムである。また、直接接触法におけるnegative reference materialは組織培養用プラスチックシートで、positive reference materialはZDEC含有ポリウレタンである。これらはISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5 : Tests for in vitro cytotoxicity (2009)に定められている[467]。すなわち、bulkの生体材料のreferenceは素材の全く異なるbulkの材料であることが、国際的に認められている。粒子物質のみ例外であるということは、合理的でない。

そもそもナノサイズの繊維状粒子物質の悪評は、アスベストの問題によるところが大きい。CNTsは、大きさと形状がアスベストに似ているために、その毒性が大きく取り上げられてきた[281, 282]。しかし、これは吸い込みによる毒性の問題であり、生体材料としての毒性は吸い込みによる毒性とは全く異なる。近年、球状の酸化チタン粒子が吸入で発癌性があるという報告が発表されているが[468]、形と大きさだけを問題にするなら球状のナノ粒子も全て生体材料に使えないことになってしまう。すると、ほとんど全てのナノ粒子が生体材料に使えないことになり、この論理がナンセンスであることは、誰の目にも明らかである。繊維状であること、すなわち細長い形状と大きいアスペクト比が問題であるなら、すでにカーボンファイバーがアキレス腱修復などで、生体材料として臨床で安全に使用された歴史があり、もちろん発癌性など全くなかったことを忘れてはいけない[96, 469, 470]。ナノサイズの粒子物質に対する生体反応に注目して、CNTsの毒性を評価することが最も合理的である。

5-2 ナノサイズの人工粒子物質からなる生体材料

最適なreferenceを見出すことができなかった第二の理由は、これまでにナノサイズの粒子物質を生体材料に用いたという前例がなかったためである。これはCNTsに限らず、近年研究が急速に進んでいる様々なナノ粒子の生体応用に、共通の問題点である。ナノサイズの粒子が使用されている医薬品はすでに臨床応用されており、例えばabraxaneは、抗癌剤のpaclitaxelとalbuminが結合したナノ粒子で、生体内で分解して抗癌剤を放出する。このようなこれまでに使用されてきたナノサイズの粒子は、生体内で分解することを利用したDDSに特化した使

用方法であるため、生体内でほとんど分解しないナノ粒子の生体材料と同等に論じることはできない[301]。

これまでに一般に生体に用いられてきた人工物質は、化学物質、生体分解性を有する材料、生体分解性を有しないbulkの材料、マイクロサイズ以上の粒子物質の4種類だけである。ナノサイズの粒子物質を生体内に入れるという概念がなかったのである。化学物質、生体分解性を有する生体材料、bulkの生体材料はすでに古くから人体に入れられ、その安全性が実証されてきた物質が多数ある。この経験的な理由だけから、これらの物質をreferenceに用いることができたのである。はるか昔に、これらの物質が最初に生体材料として使用された時には、現在のような詳細な毒性の科学的評価を行わずに、人体に埋め込むことが可能であった。その中から、偶然人体に安全性が高かった運の良い物質が残り、現在まで使用され続けてきた。この幸運な物質の一部をreferenceとして毒性試験を行い、同じ範疇に属する他の物質の安全性を明らかにし、さらにその物質をreferenceにして、他の類似物質の安全性を明らかにしてきた。このようにして、莫大な数の物質が臨床応用できるようになってきたのである。現在国際的に認められ、きわめて有効に機能しているISOの安全性評価法の規格も、このような歴史から生まれた[467]。決して安全性評価のためreferenceを新しく作成したのではなく、既存の生体に安全な物質を指定しただけである。マイクロサイズ以上の粒子状生体材料は、例えば顆粒状ヒドロキシアパタイトであるが、従来の生体材料と同様の安全性評価のみで生体応用され、これまでに大きな問題を生じていない[471-473]。これに対して、CNTsをはじめとするナノサイズの粒子物質という新しい範疇の生体材料は、マイクロサイズ以上の粒子物質と同等とは認められず、従来のbulkの生体材料やヒドロキシアパタイト粒子をreferenceに用いることは疑問視される。ナノサイズの粒子物質は、これまでに人体に使用されてきた歴史がないために、安全性が実証されている絶対的なreferenceがないのである[474]。

以上の理由から、人体に絶対安全なことが確認されているCNTsの毒性試験のreferenceを得ることは、絶望的であるように思える。しかし、発想を転換し、広い視点から考えることにより、意外なナノ粒子の存在に気が付くことができる。我々は、純度の高いカーボンブラックがCNTsのreferenceになると考えた。その理由は、純度の高いcarbon blackは、刺青に使用される黒色インクの主成分であり、黒色の刺青は長年にわたり人に応用され、現在も莫大な人が使用しているからである。ここでは、刺青の黒色インクがナノサイズのカーボンブラックであることを示し、それをreferenceに用いたCNTsの生物学的安全性評価の概要を示す。

5-3 ナノサイズのカーボンブラック粒子をreferenceに用いたCNTsの安全性評価

5-3-1 刺青はナノサイズのカーボンブラック粒子である

一般に市販されている2種類の黒色刺青を購入し、成分を詳細に分析した。刺青を乾燥して析出した固体成分を、走査型電子顕微鏡 (SEM) で形状を観察したところ、直径数10 nmのほぼ均一な粒子が集積していた (図 8 a)。さらに SEMで観察した粒子を、エネルギー分散型 X線分光法 (Energy Dispersive x-ray Spectroscopy: EDS) を用いて元素組成分析を行った。結果は両者ともCが約99.5 wt%で、不純物は刺青によって異なったが微量なNaやSが含まれており、界面活性剤が添加されているためと考えられた。一般の工業用カーボンブラックをコントロールとして、黒色刺青の粒子のラマン分析を行ったところ、共にコントロールとほぼ同じラマンシフトであった (図 8 b)。さらに透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察すると、黒色刺青の粒子は一般のカーボンブラックとほぼ同じ形状の粒子であった (図 8 c)。以上より、黒色刺青の粒子はカーボンブラックそのものであり、MWCNTs と同じくナノサイズのカーボン粒子であることが明らかになった[97]。

一方2012年6月に、デンマークから “Chemical Substances in Tattoo Ink” というタイトルの報告書が発表された[475]。これは、Danish Technological Institute in co-operation with Bispebjerg Hospital and the National Food Institute, Technical University of Denmarkが行ったプロジェクト研究で、カーボンブラックは黒色の刺青の主要な成分であること、そのカーボンブラックの毒性評価を行ったところ、生物学的安全性に全く問題がなかったことが記載された。

刺青は、太古の昔から莫大な数の人の体に埋め込まれているが、人体に大きな障害を生じておらず、現在でも多くの人々が好んで刺青を入れている。すなわち歴史的に人体への安全性が実証されている生体材料であるといえる。この刺青が、CNTs と同じくナノサイズのカーボン粒子で、炭素純度の高いカーボンブラックあることが確認できたため、CNTsのreferenceとして適切であると考えた。

5-3-2 CNTsとカーボンブラックの特性の比較

この刺青に用いられる生体に安全なカーボンブラックをCNTsのreferenceに用いるためには、両者の特性がある程度一致していることが望ましい。Bulk materialsは、特性がかなり異なっても、国際的な基準とするために現在のreferenceが定められており、大きな問題なく安全性評価が実施されている。これは、すでに長年の研究が蓄積されてきたから可能になった。しかし、ナノ粒子の生体材料は、これからreferenceを見出していかなければならない。その際に、最初は特性が似ているものを使用した方が、安全性評価の精度が高くなる。

粒子物質の特性は様々に分類できるが、代表として挙げられるのは、組成、大きさ、形状、表面化学である[476]。この4つの特性について、CNTsとカーボンブラックを比較した(表2)。組成はともに純度の高い炭素であり、合致している。大きさはともにナノ物質という点で一致している。これは、現在ナノ物質は3つの次元の1つ以上が100 nm以下のものと国際的に認知されていることから明らかである[477, 478]。形状は、CNTsは繊維状粒子でカーボンブラックは球状粒子であり、異なっている。表面化学は様々な分類方法があるが、親水性と疎水性に分類することが最も一般的である。CNTsは疎水性であり、カーボンブラックも表面処理をしていなければ基本的には疎水性である。このように、粒子物質の代表的な4つの特性のうち3つが一致していることから、カーボンブラックをCNTsのreferenceに用いることは、論理的である。繊維状粒子と球状粒子の違いがあるために、これを否定する研究者がいるかもしれない。しかし、そもそも全く同じ特性をもつreferenceはあり得ない。むしろこれほど特性の似ている物質が生体に使用されており、その安全性が人体で実証されていることは、他に適切なreferenceがないことを考えれば、きわめて幸運な偶然である。また、ナノ粒子が繊維状であることの問題点についての考察は後に6-2章で行うが、結論だけを述べれば、in vivoの埋め込み試験においてCNTsによって炎症が持続しない部位では、ナノ粒子が繊維状であることハザードはない。

CNTsとカーボンブラックの組成が同じであるということは、特に大きな意義を持つ。共に同じ純度の高い炭素であるため、質量を基準として全ての実験を行うことができるからである。粒子物質の場合、粒子数や体積を計測することは困難なことが多く、最も簡便な質量を基準として比較できることは、安全性評価を行う際にきわめて大きな利点である。カーボンブラックは他のナノ物質を生体材料に使用する場合にも、生物学的安全性評価のreferenceに用いることが可能である。しかし、密度が大きく異なる物質の場合には、質量を基準として比較することができないため、粒子数など他の基準を使用しなければならず、手技が難しく精度も低くなる。

一方、CNTs以外のcarbon-based nanomaterialsを生体材料に応用する研究も、CNTsほど多くはないが、着実に進められている。例えばfullerenesやgrapheneを、DDSやイメージングに用いる研究が行われており、これらの生体安全性評価も重要である[479, 480]。また、従来ナノサイズではなかったcarbon fibersが、近年の技術の進歩でナノサイズの製品が得られるようになった。carbon fibersはこれまでも生体材料として臨床に用いられてきたため、新しいnano-biomaterialsとして有力な候補であるが、ナノサイズであるための安全性評価は、再度行う必要がある[214, 481]。これらのCNTs以外のcarbon-based nanomaterialsの安全性評価にも、カーボンブラックは適切なreferenceになる。

5-3-3 安全性試験

MWCNTsの皮下埋め込み試験を、刺青に用いられるカーボンブラックをreferenceとして実施した。結果は、MWCNTsは皮下組織で急性炎症反応を惹起するが軽度であり、炎症反応は早期に沈静化することがわかった。また、皮下に埋め込まれたMWCNTsは早期にマクロファージに取り込まれ、長期間マクロファージ内に留まっていることが明らかになった。このMWCNTsに対する短期から長期にわたる生体の組織反応は、刺青に用いられるカーボンブラックに対する組織反応と酷似していた(図9)。これはMWCNTsを生体内に埋め込んだ時、局所における生体親和性が良好であり、刺青と同様に長期にわたりマクロファージ内に取り込まれて安定していることを示している[97]。

次に、刺青のカーボンブラックをreferenceに用いて、in vitroのMWCNTsの細胞毒性試験としてコロニー形成試験を行った。MWCNTsは濃度依存性にコロニー形成を阻害し、刺青のカーボンブラックも同様に濃度依存性にコロニー形成を阻害した。濃度が高くなると、MWCNTsは刺青のカーボンブラックより多いコロニー数を示した(図10)。以上より、MWCNTsの細胞毒性は、刺青のカーボンブラックと比べて同等以下であることが明らかになった[97]。ナノ粒子の細胞毒性を評価する場合、本研究で用いたコロニー形成試験は数量化が可能であり、感度や再現性の点でも、現在最も優れた評価法と考えられる[402]。

さらに、刺青のカーボンブラックをreferenceとして、発癌性動物を用いたCNTsの皮下埋め込み発癌性試験を行った。発癌性動物は、遺伝子導入マウスであるrasH2 mouseを用いた[482-485]。近年rasH2マウスはbulkの生体材料の発癌性試験にも使用されている[486-488]。結果は、CNTsを皮下に埋め込んでも、新生物を全く発生しなかった。referenceであるカーボンブラックを埋め込んだ群は1匹死亡したが、病理組織検査では、明らかな腫瘍を認めなかった(図11)(表3)。本研究で埋め込んだMWCNTsはマウス1kgあたり75mgで、これまで通常のマウスで行われた埋め込み試験と比較して、明らかに高容量である[89, 91, 155, 304]。以上から、遺伝子導入発癌性動物を用いて初めて行ったCNTsの皮下埋め込みによる発癌性試験の結果は、CNTsは刺青のカーボンブラックと同様に発癌性が認められなかった[98]。

以上の実験により、刺青の成分であるナノサイズのカーボンブラック粒子をreferenceに用いると、CNTsの安全性評価ができることを示した。また、生体内埋め込み試験、細胞毒性試験、遺伝子導入マウスによる発癌性試験などを行うと、CNTsはいずれも刺青のカーボンブラックと同等以下の毒性であった。このように、すでに生物学的安全性の明らかな物質をreferenceとして用いた安全性評価試験を行い、同等かそれ以下の毒性を示せば、その試験に関しては、CNTsは

安全であると結論することができる。我々は現在、純度の高いカーボンブラックをreferenceとして、突然変異誘発試験や遺伝毒性試験を行っている。これまでの結果では、これらの試験でもCNTsはカーボンブラックと比べて同等の安全性を示している。

6. 考察と展望

6-1 CNTsを生体材料に応用するためのこれまでの安全性評価

この総説では、CNTsを生体材料に応用する研究を概観し、これまでに発表された生体材料としての安全性評価研究を、*in vivo*と*in vitro*に分けて示した。CNTsを生体材料に応用するメリットは明らかであり、その対象となる医療は癌治療、再生医療、インプラント、DDSなど幅広く、しかも一つ一つが重要性の高いものばかりである[180, 489-491]。これらの応用研究の発展を、そのまま臨床に生かすことができれば、現在の医療が大きく進歩することは確実である。このためにCNTsを生体材料に応用する研究が現在急増しているが(図1)、実際にはCNTsの臨床応用は一つも実現していない[77]。その理由は、CNTsの生体材料としての生物学的安全性について、確証がないためである。ある新しい材料が生体に危険性があるというのは容易である。一つの試験でも安全性に疑問がある結果が出れば、危険性があるということができる。しかし、生体に安全であるというためには、想定される状況が全て安全であることを証明しなければならない。このためには、数えきれない試験を行わなければならない、現実的には不可能である。このため、可能な範囲で多く試験を積み重ねて、ある時点でそれらの結果を総合し、大多数の専門家が納得できる論理的な判断を下すべきである。そうでなければ、新しい生体材料を臨床応用することは、全くできなくなってしまう。CNTsの生体材料への応用は、既にこの判断を下す時期に到達している。この総説の最大の目的は、CNTsを生体材料に応用しても安全であるか否かを論理的に判断し、臨床応用が可能であることを明らかにすることである。

この困難な課題を解決するために、これまでに先駆的な多くの研究者が、懸命にCNTsの生体材料としての安全性評価に取り組んできた。ここで注意しなければならないのは、使用されてきたCNTsは多種多様であり、試験方法も各研究者によって大きく異なることである。このため、個々の研究によって結果が異なることがしばしば認められた。しかし、それらを総合して判断する必要がある。この目的のために本総説では、これまでの関連する論文を網羅し、可能な限り最新の研究成果を提示した。これにより得られた明確な結論は、研究成果が積み重ねられるごとに、CNTsは生体材料として生物学的安全性が高いという評価が多数を占めるようになってきたこと、特に近年発表された総説のほとんどが、CNTsは安全性が高いと述べていることである[91, 99, 191, 326, 492]。これまで行われた多数の研究結果を総合した結論は、適切な使用方法と使用部位で、適切な段階を踏んで進めていけば、CNTsは生体材料として臨床応用が可能である。

6-1-1 in vivo研究

本総説でみてきたように、in vivoの研究でCNTsが発癌性のような生命に関わる重篤な毒性を有するという報告はこれまでにない。さらに最近の研究では、純度の高いCNTsを使えば、生体に埋め込んでも強い炎症は引き起こさず、早期に鎮静化するという報告がほとんどである[58, 89, 91, 155, 304]。CNTsが血流にのった時にどの臓器に集積し、その組織、細胞がどのような反応を示すか、長期にわたり蓄積されるのかという問題は重要である。現在までのCNTsの静脈内注射の研究結果は、多くの論文で問題がないと報告されている[91, 191, 310]。しかし、CNTsを静脈内に多量に注入するDDSやイメージングに使用する場合は、さらに精度の高いCNTsを追跡する技術を開発し、体内動態を詳細に観察しなければならない。このような研究は、吸入の場合に肺から血流に乗る可能性があるため、世界中で進められている[86, 144, 306, 312-315]。このため、CNTsが血流に乗った場合の体内動態の全貌は、早急に明らかになるであろう。現時点では、CNTsを血流に乗せる方法による臨床応用は、多くのデータが揃いその安全性が確認されるまで、待機するべきである。

一方、CNTsを生体材料として局所で使用する場合は、CNTsが血流にのるか否かを明らかにする必要がある。CNTsは化学物質ではなく、太さと長さを持った粒子であるため、血流にのらない限界値が存在するはずである。現時点では、少なくともある程度の大きさをもったMWCNTsは血流に乗る可能性が少なくと考えられている[310]。たとえ局所から血流に乗ったとしてもその量は極めて少なく、生体に大きな障害をもたらさないという研究結果が多い[91, 139, 191, 310]。

以上のように、これまでのin vivoの研究から得られる論理的な結論は、少なくともMWCNTsは、生体材料として局所に使用することができる可能性が高いということである[152]。もちろん、生体材料として使用する臓器や組織によって高い炎症反応を示す部位や、血流に移行しやすい部位があると考えられる[304]。このため、それぞれの部位で個別な検討を行い、臓器、組織ごとのハザードを決めなければならない。

6-1-2 in vitro研究

一方、in vitroの毒性試験は解釈が難しい。これまでにbulkの生体材料の毒性評価は、ISOに代表される科学的な国際基準が設定されている[467]。しかし、CNTsのようなナノ粒子の生体材料は、化学物質ともbulkの生体材料とも異なる性質を持つため、その評価方法は定まっていなかった。現在までに発表された論文のほとんどが、CNTsを溶液に十分に分散させたうえで、化学物質のように取り扱ってきた。これは、粒子物質の評価として現在最も合理的な方法と考えられる。2012年にOECDは、「従来の化学物質についての試験・評価法の大半はナノマテ

リアルにも適しているが、場合によってはナノマテリアルの特性に合わせた修正が必要である」と発表している[493]。

in vitroにおけるCNTsの毒性研究で気をつけなければいけないのは、CNTsに関連する様々な要素の中の何を観察しているかを、明確に判断することが難しいことである。CNTsに関連する要素とは、CNTs本来の太さ、長さ、形状、表面の反応性、凝集性などに加えて、遺残金属の影響、分散剤の影響、測定試薬の影響など多彩である[117, 263, 334]。これらは、相互にも関連性があるので、個別に評価することが難しい[494, 495]。これまでの研究を見ると、CNTsの太さと長さの違いは、細胞毒性に関与する。SWCNTsへの生体反応とMWCNTsの生体反応では、毒性において違いがあり、例えばSWCNTsはMWCNTsに比べて、酸化ストレスを誘導しやすい。長さも重要であり、長いCNTsはマクロファージが貪食しきれないため、酸化ストレスを誘導しやすい。確定的な数値ではないが、吸入の場合には長さが10-20 μm 以上で毒性が高くなるという報告がある[412]。生体材料として用いる場合の長さの限界値は明らかにされていないが、6-2章で述べるように、吸入のように問題にならないと考えられる。また、表面の反応性はCNTsによって異なり、さらに表面の化学的修飾を行ったCNTsは、個々に毒性を十分に検討するべきである。遺残金属の影響は無視できないが、純度が高いCNTsでは、大きな問題を生じないという報告が多い[72, 365, 400-402, 407, 408, 496]。一方、CNTsの凝集性や分散剤の影響が毒性試験の結果に影響を与える可能性があることは、ナノ粒子のin vitro研究に共通した独特の問題点である[483]。これまでの研究では、結局CNTsと分散剤の総合的な毒性をみていると考えられるものが多い[371, 373, 385, 497]。さらに、CNTsの凝集性と分散剤が研究者によって大きく異なるため、それぞれの毒性試験で使用するCNT溶液の濃度が、1ng/mlから10 $\mu\text{g/ml}$ まで大きな幅が出てしまい、評価をますます困難にする[309, 447]。今後のin vitro研究は、可能な限り細胞に影響を与えない分散剤の種類と、CNTsが凝集しない適切な濃度の幅を規格化して研究を行うべきである。

6-1-3 in vivoとin vitroの相関性

in vivoとin vitroのデータの相関性については、薬物などの化学物質と異なり、CNTsではほとんど明らかになっていない[498]。この理由の1つは、実際にナノ粒子が生体材料に使用されたことがないため、相関性を定めるためのデータがないことであるが、これは臨床応用を待たなければ解決しない。もう一つの理由は、in vivoの試験で使用する動物種や投与方法、in vitroの試験で使用する細胞の種類、培養液など、結果に影響を与える様々な要素が、規格化されていないことによる[91]。今後は、これらの要素を一定にして、国際的にデータを積み重ね、少なくともマウスのような小動物におけるCNTsのin vivoとin vitroの毒性

評価の相関性を明らかにしていくことが必要である[191]。

6-2 CNTsの安全性評価のための適切なreference

6-2-1 Referenceの必要性

これまで発表されたCNTsを生体材料に応用する論文において、数年前は安全性に関する研究は少なく、しかも相反する結果が多かった。しかし、論文数の増加とともに安全性評価に関する研究が増加し、結果が蓄積されるにしたがって、CNTsは生体材料として安全性が高いという結論に集約されてきた[89, 91, 99, 191]。しかし、それでもCNTsの毒性を否定できずに臨床応用に踏み切れなかった最大の理由は、安全性評価のための最適なreferenceが見つからなかったためである。この不明であったreferenceを明らかにすれば、CNTsの安全性評価研究は一気に加速する[68]。CNTsは、他のすべての生体材料と同じく、どんなに生体親和性が良くても生体には異物である。ある濃度以上のCNTsを生体や細胞に作用させると、毒性を示すのは当然である。この時、安全性が実証されているreferenceがなければ、生体に安全かそうでないかを判断することは、困難である。例えばCNTsをある細胞に作用させて細胞毒性を調べる際に、CNTsがある濃度以上では、細胞は濃度依存性に活性を失う。その時にCNTsは細胞毒性があるという結論を出すのは誤りである。安全性が実証されているreferenceを同様に細胞に作用させて同じように濃度依存性に活性を失えば、CNTsは細胞毒性がないという反対の結論が正解である。安全性評価において、このように生体に安全なことが実証されたreferenceがなければ、生物学的安全性を確認することはできない。しかし残念ながら、これまでただの一つも、CNTsの生体材料の安全性評価のためのreferenceが見出されていなかった。CNTsの毒性研究の結果が一致せず、安全性評価が定まらなかったのは、当然である。生物学的安全性が確認されているreferenceがなかった理由は、ナノサイズの粒子物質の生体材料はこれまでに存在しないと考えられていたからである。

6-2-2 カーボンブラック

我々は1つのreference material（カーボンブラック）を見出し、2011年と2012年に研究論文で提案した[97, 98]。カーボンブラックは黒い刺青の主成分で、刺青は人類の有史以前から人体に使用され、現在でも多くの人体に埋め込まれている。よってカーボンブラックはその生物学的安全性が歴史的に莫大な数の人によって証明されてきたといえる。カーボンブラックをCNTsの毒性評価のreferenceに用いることに、疑問をもつ研究者がいるかも知れない。なぜなら、CNTsとカーボンブラックは形状が全く異なるからである。CNTsは繊維状であり、カーボンブラックは球状であるため、決定的な違いであると考えられるのも尤もで

ある。しかし、これは吸い込みの毒性を念頭においた考え方である。現在ナノ粒子が繊維状であることの問題点は、集約すれば1つに絞られている。それは、長い繊維を細胞が取り込みきれないということである。細胞がいわゆる *frustrated phagocytosis* と呼ばれる状態に陥り、酸化ストレスなどで炎症を持続させるとされている[281, 409, 411, 412]。しかし、これは吸い込みによる胸腔や、胸腔の代用として実験が行われる腹腔で、CNTsにより炎症反応が長期間持続している現象を説明するための現象である。かなりの量のCNTsを皮下などの組織に埋め込んでも、一時的に軽微な炎症しか生じず、すぐに鎮静化してしまうことは、多くの研究者によって確認されている[58, 307-309]。この事実から、少なくとも皮下組織では *frustrated phagocytosis* は生じていないとみなすことができる。すなわち、*in vivo* の埋め込み試験においてCNTsによって炎症が持続しない部位では、*frustrated phagocytosis* は生じていないのだから、ナノ粒子が繊維状であることの危険性はないといえる。一般的に、動物実験においてCNTsの炎症が長期間持続する部位に、CNTsを粒子として埋め込むことはありえない。よって、きちんとした *in vivo* の埋め込み試験を行い、持続する炎症が認められなければ、CNTsを生体材料に応用する場合に、繊維状であることの問題はない。

そもそも、特性の全てが一致していることが *reference* の条件ではない。それは、*bulk* の生体材料でも同じで、特性が異なっても *reference* として使用され、十分その役割を果たしているのである[467]。重要なことは、CNTsもカーボンブラックも、ナノ粒子物質という新しいカテゴリーの生体材料に属するという点である。論理的に考えて、*bulk* の生体材料と同様に、CNTsの *reference* には特性が異なっても同じカテゴリーも属するカーボンブラックを使用することに問題はない。さらに有利な点は、CNTsもカーボンブラックも共に純度の高いカーボンからできているため、質量を基準として比較できることである[97, 98]。毒性試験を行う際に、質量は粒子数や体積に比べて、圧倒的に使用しやすい基準である。これらの点から、CNTsの適切な *reference* として純度の高いカーボンブラックを提案する。

実際に、これまでのCNTsの生体反応評価の *reference* に、カーボンブラックが使用された論文は多い[292, 365, 381, 499-506]。しかしその際に、カーボンブラックが生体に安全であるという、明確な根拠が示されることはなかった。これまでにCNTsの *reference* にカーボンブラックを使用してきた多くの研究者達は、科学者の直観としてカーボンブラックが最適な *reference* であるとみなしたのであろう。われわれは、多くの研究者の直観に、「カーボンブラックは黒い刺青の成分であるから安全である」という根拠を付け加えただけである。またこれらの論文が多数あることから、この総説で示したCNTsの安全性評価の *reference* としてカーボンブラックが適していることについて、多くの研究者が賛

同してくれると考える。

6-2-3 国際基準

カーボンブラックがCNTsのreferenceに適していることに賛同が得られたら、すぐに開始すべきことは、このreferenceを使ったCNTsの安全性評価を、in vivoとin vitroで多角的に行うことである。前述したように、「危険性があるかもしれない」というのはやさしいが、「危険性が全くない」というのは困難である。できるだけ多くの研究者が、できるだけ多くの試験を実施する必要がある。その際に、すべての試験を、referenceとして同じ規格のカーボンブラックを用いて行えば、結果を統合して評価することが可能になる。

カーボンブラックといっても様々な種類があり、それぞれの生物学的安全性は少しずつ異なる。この中でCNTsの適切なreferenceになるのは、刺青に使用されているカーボンブラックと同等の、ナノサイズで純度の高いカーボンブラックである[475]。現時点では、直径約50nm、純度99.5%以上のカーボンブラックが適当と考えるが、多くの専門家の議論により、最適なカーボンブラックを決定し、国際基準とすることを提案する。

カーボンブラックをreferenceに用いる際に気を付けなければならないことは、CNTsの方がカーボンブラックより試験溶液に分散しにくいいため、分散剤（一般的には界面活性剤）を正しく使用することである[366-371]。CNTsが十分に溶液に分散する濃度の分散剤が、生体または細胞に大きな影響を及ぼさないことを確認し、referenceであるカーボンブラックの溶液にもその分散剤を同様に使用するべきである。特にin vitroの試験の場合、時間経過とともに粒子が沈殿してくると、その沈殿速度によって細胞の反応が異なってくる。正確にreferenceと比較するためには、できるだけ粒子が沈殿してこない分散剤が望ましい。我々は現時点では、分散剤としてpolyvinyl alcoholが最適であると考えている[97]。しかし、分散性、毒性、取扱いやすさなどの点でさらに優れた分散剤がある可能性があり、やはり専門家の議論を十分に行い、国際基準の分散剤を定めるべきである。

6-2-4 安全性評価の方法

CNTsの毒性がreferenceであるカーボンブラックと同等またはそれ以下であれば、「生体材料として安全」と評価する。その試験はそれ以上行う必要がなく、判断をくだすことができる。カーボンブラックより毒性が強ければ、判断は保留になる。現時点ではreferenceが一つしかないため、これ以上の評価は厳密には不可能である。しかし、毒性試験の結果がカーボンブラックより極端に悪い場合（例えば毒性を示す濃度が1ケタ小さい場合）は、要注意であろう。一方、CNTsもカーボンブラックも毒性が全くでなければ、本当に毒性がないのか、試験条

件が適切でないかどのどちらかである。これらの点に注意して、カーボンブラックを共通のreferenceとして、CNTsの様々な安全性評価を積み重ねていくことを提案する。残念ながら、in vivoの生体内動態評価には、カーボンブラックをreferenceとして用いることはできない。ナノ粒子物質が組織から血流に移行するか、血流に乗った粒子が体内のどこに集積するかなどは、粒子の形状の影響が大きすぎるからである[327]。カーボンブラックのような球状粒子は、CNTsのような繊維状粒子に比べて、組織と血管の間の移行が容易である。しかし、CNTsの生体内移動を調べるためにreferenceを置く必要はない。もし試験の結果、CNTsがある臓器に集積することが明らかになったら、その局所での生体反応の評価には、カーボンブラックをreferenceとして、CNTsの埋め込み試験を行えばよい。

6-3 CNTsを用いた生体材料の臨床応用の決断

本総説で見てきたように、純度の高い、欠陥の少ないpristineのMWCNTsが生体材料としての安全性が高いことは、これまでの多くの研究者の努力により明らかになった。MWCNTsを局所に使用することは、肺や腹腔のような特殊な部位でなければ、人体に安全である[91, 191, 305, 306]。DDSなどで血流にのせる使用方法の安全性は、現時点では十分に確認されていないと判断するべきである。さらに我々は、刺青に使用されるカーボンブラックというreferenceを用いて、pristineのMWCNTsがカーボンブラックと同等以上の安全性があることを明らかにした[97, 98]。

CNTsを生体材料に応用する研究が高度に進み、使用方法と使用部位さえ適切であれば、生体材料として安全な可能性がきわめて高いという判断が得られたことから、今こそ勇気をもってCNTsの臨床応用を決断する時である。我々は、炭素純度が99.5%以上、平均直径約60 nm (40-90 nm)、平均長さ約10 μ m、非表面積25-30m²/gのCVD法で製造したMWCNTs (MWNT-7, Hodogaya Chemical, Tokyo, Japan)を用いて、臨床応用を開始する予定である。もちろん最も安全性が高い、CNTを5wt%以下しか含まない複合材料の臨床応用である。

6-4 CNTsを用いた生体材料の臨床応用の道筋

CNTsの臨床応用において重要なことは、最も安全な使用方法から開始することである。すなわち、CNTsの臨床応用は、危険度の大きさよって段階を踏んで進んでいくべきである。CNTが複合体か粒子か、使用部位が局所か全身か、粒子の生体暴露が少ないか多いかで、危険度を評価し、Stage分類した(表4)。

最初の段階は、CNTsを複合材としてインプラントに使用するStage 1である。一般に複合材におけるCNTsの含有量は10 wt%以下であり、生体内にCNTsが粒子として露出することが全くないか、きわめて少ない。このため、CNT固有の

問題が人体に生じる可能性はないか、きわめて低い。われわれは、最初のCNTsの生体応用として、前述のMWCNTsと既存の生体材料の複合材を、人工関節または脊椎固定材料に使用することを計画している。

人工関節においては、MWCNT/ポリエチレン複合材とMWCNT/セラミックス複合材を開発している。人工関節の摺動部に用いられているポリエチレンは超高分子量ポリエチレン (ultra high molecular weight polyethylene: UHMWPE) であるが、長年使用していると摩耗して再手術が必要になる[242-245, 507]。このため現在クロスリンクUHMWPEが用いられるようになったが、今度は硬すぎて破壊しやすいという問題が生じている[508-512]。MWCNT複合UHMWPEは、摩耗しにくく破壊しにくいという、従来達成しえなかった特性を有するため、人工関節の摺動部材に適している(図12)。一方、セラミックスも人工関節の摺動部に用いられる。セラミックスは摩耗することは少ないが、破壊しやすいために再手術が必要になる[513-518]。CNT複合セラミックスは破壊靱性値が高いため、摩耗も破壊もしない、理想的な人工関節の摺動部材になる。

脊椎固定材料には、MWCNT/PEEK複合材を開発している。PEEKは生物学的安全性や機械的特性において優れた特質をもち、多くの可能性を秘めた生体材料である[519, 520]。しかし骨親和性が低いため、脊椎固定用ケージのような骨と接するインプラントに用いると、骨癒合が不十分になるという問題があった[521-524]。MWCNTsは骨誘導能を有することが、我々を含めて多くの研究チームから報告されている[58, 62, 63, 67, 213, 215, 216, 218, 525, 526]。MWCNTsを複合することにより、PEEKの機械的特性をさらに向上させるだけでなく、骨形成を誘導することができれば、理想的な脊椎固定材料になる(図13)。

2012年9月にECは医療機器へのナノ表示を義務づける規則改正案を発表し、ナノマテリアルを含む医療機器に関して表記することと、最大の危険度を示すClass IIIに分類することを提案したが、このような医療機器を本来の目的で使用した場合に、ナノマテリアルが患者および使用者の体内へ侵入するのを防ぐためのカプセル化や結合等の対策がなされていない場合に限るとした[527]。すなわち、CNTsを複合体として生体材料に使用する場合には、母材と結合しているため、法的規制に係らない可能性がある。このように、Stage 1は危険度がきわめて低く、各国のきちんとした法的手続きさえ踏めば、今すぐに実施しても問題がないと考える。

次にCNTsを粒子として生体応用するStage 2に入るが、ナノ粒子物質が直接生体と接するこの段階が、最初の大きな関門である。この使用方法は、前述のECの定義からも法的規制の対象になり、倫理的にも国際的な承認が必要であると考える。すなわち、生物学的安全性評価の国際基準が構築された後に、詳細な評価が行われていることが前提である。最初は必ず局所での使用に限定するべ

きである。しかも、CNTsを用いるベネフィットがリスクより極めて高い場面での使用が、先陣を切るべきである。他に治療する手段がない、あるいはCNTsの治療が圧倒的に有利である場面、すなわち癌治療への応用であろう。これは、現在CNTsに最も期待されている臨床応用分野である。CNTsを癌治療のためのDDSやイメージングに応用することが可能になれば、治療と診断に格段の進歩が期待でき、多くの患者が恩恵を受けることは明らかである。

次のStage 3も、CNT粒子の局所での使用である。しかし、Stage 2より高い安全性が求められる疾患へ応用を進めていく。再生医療の足場材、糖尿病などの癌より緊急性を要さない疾患の治療や診断などの局所治療にCNTsを臨床応用する。この段階はまた、対象疾患と使用部位が大きく広がり、CNTsの生体材料への応用が一般的になる段階である。Stage 2とStage 3は、リスクは同じであるがベネフィットが異なる。

最後に、CNTsを薬物のDDSや全身のイメージングのために、注射により血流に乗せて全身に循環させる治療に応用する、Stage 4に進むことになる。しかし、この決断は極めて慎重に行う必要がある[327]。2012年の時点で、欧州委員会 (EC) はナノマテリアルが関与する医薬品を20種類認可しているが、もちろんCNTsは含まれていない[301]。CNTsを応用した薬物のDDSや全身イメージングは、医療において極めて有効であるが、血流に乗せて全身を循環させるリスクは大きい。CNT粒子の体内動態や、心臓・肺・肝臓・脾臓・腎臓などへの影響を詳細に検討し、国際的なコンセンサスを得たうえで、臨床応用に踏み切るべきである。現時点では、将来的にStage 4への移行が可能であるかは、全く不明である。

これらの臨床ステージを、慎重に一步一步登っていくことが重要である。それにより各ステージにおけるCNTsの安全性が実証され、さらにCNTsの生体応用技術が向上すれば、現在の医療技術が大きく前進し、画期的な新しい治療方法が生み出されるであろう。

6-5 生物学的安全性評価の国際基準の構築

これまでCNTsを生体材料に応用するための安全性評価研究が世界中で行われてきたが、それぞれの研究者によって評価方法が異なり、結果を統一して解釈できないという大きな問題があった。すなわち、安全で効率的なCNTsの生体応用に必須の、centralized toxicity databaseの構築が不可能であった[91]。今後、生物学的安全性評価のための国際基準を早期に構築し、統一した評価方法で行われた毒性試験の結果を、すべて国際的に公表することが重要である。それにより、世界中から多数の信頼できる結果が蓄積され、多くの専門家が分析できるため、コンセンサスが得られた正確な決定を下すことができる。CNTsといっても多くの種類があり、化学的修飾を行ったCNTsについては無数の種類が考えら

れる。これらのCNTsの臨床応用をできるだけ安全かつ早期に行うために、生物学的安全性評価の国際基準の構築が早急に必要である[70, 191]。

CNTsの生体応用において、f-CNTsの安全性評価は極めて重要である。CNTsを粒子として生体に応用する目的が、主としてDDSであったり、生体イメージングであったり、再生医療の足場材であることを考えれば、ほとんどの場面でf-CNTsが使用される。また、生体応用の鍵を握るCNTsの分散性を高めるためにも、化学的修飾は重要である[331]。当然、f-CNTsはその一つ一つの安全性を調べなければならない。さらに現在は一歩進んで、CNTsをより生体に安全にするためのfunctionalizationが研究されている[257, 334, 528]。莫大な種類のf-CNTsを効率よく生体材料に応用するためには、安全性評価の国際基準の構築がきわめて重要である。

これまでのCNTsを生体材料に応用するための安全性評価研究を踏まえて、論理的に組み立てていけば、国際的な生物学的安全性評価の規格化はそれほど難しいことではない。臨床応用の順序から考えて、まずCNTsを局所で使用する規格を構築する。具体的には、最初にISOで規格化された一般のbulkの生体材料と同じin vivo試験とin vitro試験を行う。これは主として、CNTsそのものに含まれる不純物とCNTsに結合させた分子の一部または全部が溶出して生じる毒性を評価することが目的である。次にCNTsがナノ粒子であることの固有の毒性を評価する必要がある。このためのin vivo試験は、CNTsを使用する局所への埋め込み試験で、特定の臓器または組織における生体親和性を検証する。in vitro試験では、規格化した分散剤を用いてCNTsをきちんと分散させた上で、ISOに準拠した一般の化学物質と同様の試験を実施する[467]。このCNTs固有の毒性を調べるin vivoとin vitroの試験は、同じナノ粒子物質のreferenceと比較しなければ、評価ができない。そこで前述のカーボンブラックをreferenceに用いる。国際基準の統一したreferenceを用いれば、CNTsを粒子として局所で使用するための生物学的安全性評価の国際基準を早急に構築することができる。

この後で、CNTsを血流に乗せて使用する場合の安全性評価の国際基準の構築を目指す。基本的にはCNTsを十分に溶液に分散させたいうえで、やはり一般の化学物質と同じ基準でin vivo試験を行うことになるであろう。しかし、この時の最適なreferenceとなる物質が何であるかは、現時点では不明である。おそらく現在血流に乗せるDDSとして臨床応用されているノ粒子物質の中で、CNTsと少しでも性質が似ており、安全性が確認されたものを選ばれるであろう。このCNTsを血流に乗せる場合のreferenceの選択については、今後の大きな研究課題である。

いずれにしろ、CNTsの生体応用の目的が、現在の医学の最重要課題である癌治療や再生医療の革新である以上、生物学的安全性評価の国際基準の構築に、一刻も早く取り掛かるべきである。すでに安全性が極めて高いと考えられる

CNT複合材のインプラントは、臨床応用の時期が来ている。これらのインプラントの臨床評価が明らかになった時には、次の段階であるCNTsを粒子として局所に使うために、CNTsの生物学的安全性評価の国際基準を構築していなければならない。重要な医学的課題は休む暇なく、進歩し続ける必要がある。

7. 結論

CNTsを生体材料に応用する研究が激増している理由の第一は、CNTsが生体材料として極めて有効であるであることが明らかになってきたためである。理由の第二は、CNTsは生体材料として安全性が高いと認識されてきたためである。生物学的安全性が疑わしく、いつまでたっても臨床応用できる可能性がない生体材料を研究する専門家はいない。生体に100%安全であるということは論理的に不可能であるが、CNTsの生体応用研究がこれだけ世界中で行われているにもかかわらず、未だに生体に危険であるという証拠が出ないことから、安全性は極めて高いと判断することができる。この研究に関わっている研究者達のほとんどが、CNTsは使用方法と使用部位さえ間違えなければ生体に安全であると思っているのである。

CNTsのもつ生体材料としての潜在能力が最大限に発揮できれば、革新的かつ重要な医療技術が多数構築され、医学の大きな進歩を達成することができる。CNTsのもつ特性が生体材料への応用に極めて有利であることから、その臨床応用を躊躇させている生物学的安全性評価という問題点を、我々は力を合わせて早急に解決するべきである。

これまでの多数の研究者達の努力により、CNTsは生体材料として基本的に安全であるという証拠が蓄積されてきた。このため、CNTsが粒子として生体に接する可能性がほとんどなく、最も安全性が高い使用方法であるCNT複合体のインプラントを臨床応用する時期が来ている。その後CNTsを粒子として生体局所に作用させる段階に早期に進めるために、早急に世界の研究者達が力を合わせて生物学的安全性評価の国際基準を構築しておく必要がある。この際に、カーボンブラックのreferenceは威力を発揮する。最も危険度の高い段階であるCNTsを血流に乗せる臨床応用の実施は、きわめて慎重に検討しなければいけない。

多くの研究者たちの努力と最新の科学の力で、生物学的安全性評価が可能になった今、勇気をもって、しかも細心の注意を払って、CNTsを応用した生体材料の臨床使用に踏み出すべきである。

REFERENCES

- (1) Oberlin, A.; Endo, M.; Koyama, T. *J. Cryst. Growth***1976**, *32*, 19.
- (2) Iijima, S. *Nature***1991**, *354*, 56.
- (3) Van Noorden, R. *Nature***2011**, *469*, 14.
- (4) Aliev, A. E.; Oh, J.; Kozlov, M. E.; Kuznetsov, A. A.; Fang, S.; Fonseca, A. F.; Ovalle, R.; Lima, M. D.; Haque, M. H.; Gartstein, Y. N.; Zhang, M.; Zakhidov, A. A.; Baughman, R. H. *Science***2009**, *323*, 1575.
- (5) Toma, F. M.; Sartorel, A.; Iurlo, M.; Carraro, M.; Parisse, P.; Maccato, C.; Rapino, S.; Gonzalez, B. R.; Amenitsch, H.; Da Ros, T.; Casalis, L.; Goldoni, A.; Marcaccio, M.; Scorrano, G.; Scoles, G.; Paolucci, F.; Prato, M.; Bonchio, M. *Nat. Chem.***2010**, *2*, 826.
- (6) Foroughi, J.; Spinks, G. M.; Wallace, G. G.; Oh, J.; Kozlov, M. E.; Fang, S.; Mirfakhrai, T.; Madden, J. D.; Shin, M. K.; Kim, S. J.; Baughman, R. H. *Science***2011**, *334*, 494.
- (7) Kreupl, F. *Nature***2012**, *484*, 321.
- (8) Behabtu, N.; Young, C. C.; Tsentelovich, D. E.; Kleinerman, O.; Wang, X.; Ma, A. W.; Bengio, E. A.; ter Waarbeek, R. F.; de Jong, J. J.; Hoogerwerf, R. E.; Fairchild, S. B.; Ferguson, J. B.; Maruyama, B.; Kono, J.; Talmon, Y.; Cohen, Y.; Otto, M. J.; Pasquali, M. *Science***2013**, *339*, 182.
- (9) Cao, Q.; Han, S. J.; Tulevski, G. S.; Zhu, Y.; Lu, D. D.; Haensch, W. *Nat. Nanotechnol.***2013**, *8*, 180.
- (10) De Volder, M. F.; Tawfick, S. H.; Baughman, R. H.; Hart, A. J. *Science***2013**, *339*, 535.
- (11) Ganzhorn, M.; Klyatskaya, S.; Ruben, M.; Wernsdorfer, W. *Nat. Nanotechnol.***2013**, *8*, 165.
- (12) Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. *Science***2002**, *297*, 787.
- (13) Kashiwagi, T.; Du, F.; Douglas, J. F.; Winey, K. I.; Harris, R. H., Jr.; Shields, J. R. *Nat. Mater.***2005**, *4*, 928.

- (14) Coleman, J. N.; Khan, U.; Blau, W. J.; Gun'ko, Y. K. *Carbon***2006**, *44*, 1624.
- (15) Veedu, V. P.; Cao, A.; Li, X.; Ma, K.; Soldano, C.; Kar, S.; Ajayan, P. M.; Ghasemi-Nejhad, M. N. *Nat. Mater.***2006**, *5*, 457.
- (16) Peng, B.; Locascio, M.; Zapol, P.; Li, S.; Mielke, S. L.; Schatz, G. C.; Espinosa, H. D. *Nat. Nanotechnol.***2008**, *3*, 626.
- (17) Qu, L.; Dai, L.; Stone, M.; Xia, Z.; Wang, Z. L. *Science***2008**, *322*, 238.
- (18) Shannon, M. A.; Bohn, P. W.; Elimelech, M.; Georgiadis, J. G.; Mariñas, B. J.; Mayes, A. M. *Nature***2008**, *452*, 301.
- (19) Bauhofer, W.; Kovacs, J. Z. *Compos. Sci. Technol.***2009**, *69*, 1486.
- (20) Chou, T. W.; Gao, L.; Thostenson, E. T.; Zhang, Z.; Byun, J. H. *Compos. Sci. Technol.***2010**, *70*, 1.
- (21) Xu, M.; Futaba, D. N.; Yamada, T.; Yumura, M.; Hata, K. *Science***2010**, *330*, 1364.
- (22) Bakshi, S. R.; Agarwal, A. *Carbon***2011**, *49*, 533.
- (23) Xiong, F.; Liao, A. D.; Estrada, D.; Pop, E. *Science***2011**, *332*, 568.
- (24) Endo, M.; Kim, Y. A.; Hayashi, T.; Nishimura, K.; Matusita, T.; Miyashita, K.; Dresselhaus, M. S. *Carbon***2001**, *39*, 1287.
- (25) Kang, S. J.; Kocabas, C.; Ozel, T.; Shim, M.; Pimparkar, N.; Alam, M. A.; Rotkin, S. V.; Rogers, J. A. *Nat. Nanotechnol.***2007**, *2*, 230.
- (26) Scrosati, B. *Nat. Nanotechnol.***2007**, *2*, 598.
- (27) Sotowa, C.; Origi, G.; Takeuchi, M.; Nishimura, Y.; Takeuchi, K.; Jang, I. Y.; Kim, Y. J.; Hayashi, T.; Kim, Y. A.; Endo, M.; Dresselhaus, M. S. *ChemSus. Chem***2008**, *1*, 911.
- (28) Lima, M. D.; Fang, S.; Lepro, X.; Lewis, C.; Ovalle-Robles, R.; Carretero-González, J.; Castillo-Martinez, E.; Kozlov, M. E.; Oh, J.; Rawat, N.; Haines, C. S.; Haque, M. H.; Aare, V.; Stoughton, S.; Zakhidov, A. A.; Baughman, R. H. *Science***2011**, *331*, 51.
- (29) Dai, L.; Chang, D. W.; Baek, J. B.; Lu, W. *Small***2012**, *8*, 1130.