

3-1. 生体内埋め込み試験

CNTsの生体材料としての埋め込み試験で、毒性に焦点をあてた論文について概説する。CNTsの埋め込み後の局所的な反応を述べた報告では、そのほとんどが直後に軽微な炎症反応が生じるが、早期に消失することが示されている。例えばアルギン酸塩のゲルをSWCNTsに結合させて皮下に埋め込む試験[307]、poly(propylene fumarate)構成物をSWCNTsと結合させて皮下に埋め込む試験[308]、2つの異なる長さのMWCNTsを皮下に埋め込む試験などが行われているが[309]、いずれも強い炎症反応は認められなかった。我々が行ったMWCNTsをマウスの皮下に埋め込む試験でも、1週間ほど軽微な炎症が生じるが、炎症は急速に消褪し、慢性炎症に移行することはなかった。MWCNTsはマクロファージに貪食され、長期間局所にとどまっている組織像が確認された[58]。他の研究者によるCNTsの皮下埋め込み試験も同様の結果を示しており、これはCNTsに対する特徴的な生体反応である。

生体材料の一般的な生体親和性を評価するためには、皮下への埋め込み試験が代表的で簡便であるが、CNTsを実際に適用する臓器への埋め込み試験を行うことも必要である[191]。我々はMWCNTsを骨再生の足場材に応用したり、骨と接する生体材料に応用するために、骨への埋め込み試験を行った。マウスの脛骨に骨欠損を作製してMWCNTsを埋め込んだが、正常な骨修復を示し、MWCNTs粒子は修復された骨基質に取り込まれた。電顕像で、骨基質であるハイドロキシアパタイトとCNT粒子は、密に接着していた。これらの結果は、MWCNTsが骨組織と極めて親和性が高いことを示している(図5)[213]。一方、SWCNTsとMWCNTsをラットの臀筋に埋め込むと、急性炎症を生じ、慢性炎症に移行したという報告があり[76]、CNTsと筋肉の親和性については、今後も更なる検討が必要である。In vivoの各臓器への埋め込み試験では、CNTsの生体環境における様々な反応を観察することができる。これにより、内因性の分子(例えばアルブミンやヘモジデリンなど)と結合したCNTsの生体反応を解明することができる。現在、一般的な皮下埋め込み試験で炎症反応が軽微で早期に消失することはコンセンサスが得られたと考える。次の段階として、臨床応用のために個々の目的とする部位への埋め込み試験を積極的に行い、その部位での生体反応を詳細に検討すべきである。

3-2. 生体内動態

CNTsを生体材料に応用する場合に、その生体内動態の研究は重要である[304, 310, 311]。すなわちCNTsが血流に乗って体内を移動し、特定の臓器に蓄積するか、その臓器でどのような反応を示すか、どのように体外に排泄されるか等を

調べる必要がある。もちろんDDSやイメージングなど、血流に乗せて全身へ循環させ、局所への集積を期待する使用方法の場合には、直接関係する研究課題である。しかし、CNTsを複合体としてインプラントに使用する場合は血流に乗らないであろうし、CNTsを粒子として局所に使用する場合でも、血流にはほとんど乗らない可能性もある。小さいCNTsはある程度血流に乗るが、大きいCNTsは血流に乗らないということも考えられる。

CNTsを生体材料に応用するためより、むしろ吸入毒性の研究において体内動態の研究が行われてきた。肺から吸入されたCNTsは、ある程度血流に乗ると考えられている。これは、血液のガス交換を行う肺という臓器の特性による。このため、CNTsが吸入された後に肺から血流にのった後の体内動態を調べる必要があり、CNTsを静脈内注射して体内動態を調べた報告がいくつかある[86, 144, 306, 312-315]。これらの静脈内注射の結果は、CNTsを血流に乗せる生体材料に応用した場合、および局所に使用しても少量血流に乗ると仮定した場合にも、貴重な情報を提供する。現時点でのCNTsを血流に乗せた研究では、個体および各臓器において毒性がないという報告がほとんどである[191, 310]。例えば、pristineのSWCNTsはマウスの静脈内注射後少なくとも90日間体内に残っていたが、毒性の兆候を示さなかった[312]。また、また、diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)を結合させたSWCNTsまたはMWCNTsをマウスの静脈内に注射したが、急性毒性を示さなかった[306]。別の研究では、SWCNTsを静脈注射し、24時間後の評価で、安全性が確認された[305]。静脈内注射したマウスを4週間観察したが、全く毒性を示さなかったという結果も示されている[310]。実験動物に静脈注射したCNTsの集積部位については様々な報告がある。CNTsのほとんどが尿から排泄され、少量が肝臓、脾臓に集積するという報告が多い[87, 191, 316]。MWCNTs、SWCNTsの両者とも、静脈注射の研究において、最も集積しやすいのは肝臓と脾臓である点は注目する必要がある[310, 317]。CNTsが毛細血管に取り込まれて臓器に残存するため、血流が多い肝臓と脾臓が、CNTsが最も集積しやすい部位になると考えられる。肝臓と脾臓に集積することを報告している論文も、それぞれの臓器における毒性は低いと考えられている[86, 305, 306, 318, 319]。肝臓と脾臓以外の集積部位として記載されているのは、肺、膀胱、腎臓、腸管などである。これらの実験における投与量は様々であるが、20 μ g/kg body weight以下で行われることが多い。また、CNTsを分散させて注射するための溶液も様々であるが、phosphate buffered saline (PBS)であることが多い[91]。

CNTsを放射性同位元素でラベリングしてその移動を追跡する手技が、体内動態試験に利用されている。まず2002年に¹³Cが使用され、次に¹⁴Cが用いられた[320, 321]。¹⁴CでラベリングしたMWCNTsを注射したラットでは、肝臓に最も多く、続いて肺、脾臓、腎臓に取り込まれたが、徐々に臓器から除去され、血液

から腎臓への排泄によって速やかに除去された。Wangは¹²⁵Iodine-labeled hydroxylated SWCNTsを使用して、生体内分布を調べた。結果は、すぐに全身にいきわたり、その後尿と糞便に排泄された[322]。¹¹¹indiumでラベリングされたDTPAで修飾したSWCNTsと、^{99m}TcでラベリングされたMWCNTsを静脈内注射した研究でも、すぐに全身の血液循環から腎臓を経て排出された。そして、排出されたCNTsを含む尿を電顕像で観察したところ、CNTsが変化していないことを確認した[306, 323]。Dengらは、¹⁴C-aurine-labeled MWCNTsを静脈内と胃管に投与した。静脈内投与後10分で、¹⁴C-aurine-labeled MWCNTsは、肝臓に多く集積し、心臓、肺にも集積を認めたが、他の臓器には全く集積しなかった。90日後には、肝臓にのみMWCNTsが留まっていた。胃管投与では、¹⁴C-aurine-labeled MWCNTsは、胃、小腸、大腸にのみ認められ、血管内には移行しなかった。これらの実験で用いられたCNTsをラベリングしてその移動を追跡する手技は、生体内埋め込み後の体内動態試験にも応用することができる[310]。

放射性同位元素でラベリングする以外にも、CNTsの体内動態を調べるいくつかの手法が試みられている。SWCNTsは固有のラマン分光学的特徴を有しているため、ラマン分光法で体内動態を追跡することができる。Liuらは、マウスに静脈内注射されたSWCNTsの血液循環を測定し、マウスの種々の臓器と組織に含まれるSWCNTsを検出した。ラマン分光法により、マウスの腸管、糞便、腎臓、膀胱でSWCNTsが検出され、SWCNTsは胆汁および腎臓の経路を介してマウスから排泄・除去された。剖検、組織学的検査、血液化学測定において、マウスに対するSWCNTsの毒性は認められなかった[86]。また、超音響フローサイトメトリーを応用して、循環血中のCNTsをリアルタイムで検出する技術も開発されている[324]。近年、CNTsが超音波検査で造影されるという報告があり[139, 276]、将来体内動態の研究に貢献できる可能性がある方法である。

CNTsを生体材料として生体内に埋め込んだ場合の体内動態は、まだ議論の余地があるところであるが、SWCNTsは循環血液中にはいる可能性があるが、直径が太いMWCNTsは血流にのらないことがいくつかの論文で指摘されている[152, 155]。また、CNTsは生体内の多くの部位でほとんどマクロファージに食べられるが、これらマクロファージは血流に戻らないので、CNTsはマクロファージと一緒に血流にのることはないという論理は説得力がある[325]。2011年に、CNTsの皮下埋め込み後の、他臓器への移動と炎症性サイトカインの変化が報告されている。それによると、肝臓、脾臓、腎臓、心臓には集積がなく、局所のリンパ節への移動がわずかに認められたがリンパ節そのものには損傷がなかった。また、炎症性サイトカインは初期に軽度上昇したが、時間がたつと元のレベルにもどった。よって、CNTsは免疫系には問題を与えないという結論であった[326]。もちろん使用部位により、例えば心や肺などに使用する場合は要注意で

ある。また、腹腔と連続性がある卵巣や子宮への使用も避けるべきであろう。その他の部位で局所に使用する場合、少なくともMWCNTsはほとんど血流に乗らない、ごく少量乗ったとしても全身的な毒性はないというのが、現時点での結論である。

逆に血流で移動することを目指したDDSやイメージングに使用する場合は、SWCNTsの方が適しているかもしれない。この場合には、当然標的以外の臓器での毒性や蓄積を、十分に検討しなければならない。このため、CNTsを生体材料に応用する場合は、まず局所から使用するべきであり、全身投与はきわめて慎重に行うべきである。

最後にCNTsが血流に乗った場合、組織との最終関門にであるmicrovascular endothelial cellsに対するCNTsの報告がある。これはin vitroの実験であるが、endothelial cellsの透過性がCNTsによって亢進する可能性が示されている。その理由はROSが高値になること、actin filamentが再構成されることなどであり、MCP-1やICAM-1も関係しているようである[327]。これらの結果をin vivoに反映させた更なる研究が期待される。

3-3 化学的修飾の影響

このようなCNTsの生体内埋め込み試験や生体内動態試験において、注意しなければならないことは、化学的修飾を行ったf-CNTsの生体反応はpristine CNTsと違ってくこと、また結合させる分子によって違ってくことである[289, 328]。化学的修飾は一般的に、CNTsのC=C結合を酸化して破壊し、カルボキシル基をつけ、他の分子と反応させる方法で行われる[91, 329]。例えば、CNTsの化学的修飾で最も一般的なポリエチレングリコール (PEG) の結合は、主として水への溶解性を高めるために行われるが、PEGによってCNTsに対する生体の反応が変化するという報告が多い。PEGはCNTsと結合すると、免疫細胞を活性化させ、炎症性サイトカインを誘導するという報告がある[109, 330]。また、PEGと他の官能基をつけたSWCNTsを注射したマウスの好中球数の増加は、PEGだけをつけたSWCNTsで処置したマウスの好中球数の増加より大きかったことから、PEG以外の化学的修飾がPEGの影響を受けて、生体毒性を変えるという報告もある[87]。しかし、近年はPEGを結合させた方が、有害な影響を減少させるという報告が多い[77, 331, 332]。静脈内注射による生体内動態の研究では、PEGを結合させると、より早期に体外に排泄されることが報告されている[324]。PEG以外の化学的修飾も無数に存在し、生体分布に様々な変化が認められる。例えば、paclitaxelをSWCNTsに結合させるとより腸管と肝臓に局在し、rituximabを結合したCNTsは肝臓に集積しやすくなった[110, 330]。これは、CNTsに結合したそれぞれの分子によって、各臓器の様々な細胞との親和性や反応が異なるためと考

えられている。結合した官能基の大きさや、化学的修飾が共有結合か非共有結合かも生体毒性に影響を与える[88]。

一般的に、適切なf-CNTsの方がpristine CNTsより安全性が高い理由は、生体親和性の高い官能基が毒性を減じること、f-CNTsの方がpristine CNTsより水に分散しやすく、凝集を防ぐことなどが考えられる[72, 75, 86, 263, 331, 324-336]。しかし、一方では新たな毒性が生まれる可能性もある。CNTsを粒子で用いる場合の生体材料への応用は、現実的にはほとんどf-CNTsが用いられると考えられる。このため、様々な化学的修飾を行ったCNTs とpristineのCNTsとのin vivoにおける反応の違いを、それぞれの結合させる分子ごとにデータを蓄積して、代表的なf-CNTsについては世界中の研究者が利用できるようなライブラリを形成していくことが必要である。

3-4 発癌性試験

CNTsの発癌性については、生体内に埋め込む生体材料としてのin vivoの試験は、これまでにほとんど行われていない。Takagi、Poland、Muller、Nagaiらの腹腔内投与試験は、中皮組織が存在する腹腔を胸腔の代用として、吸入による中皮腫の発癌とそのメカニズムを調べる目的で行われてきた[281, 282, 288]。CNTsを生体材料として用いる場合に、腹腔に入る可能性はほとんどない。逆に言えば、腹腔に入る可能性のある部位（例えば子宮や卵巣）への使用は避けるべきであろう。生体材料を使用する一般的な部位にCNTsを埋め込んでも、一時的に軽微な急性炎症が生じるだけで、発癌性が見出されたという報告はない。生体親和性の高い炭素そのものが、発癌性を有していることは考えにくい。もしヒトで癌を誘発するとしたら、CNTsがこれまでに生体材料として用いられることがなかった繊維状のナノ粒子であるために、局所で炎症を持続させる場合だけであろう。CNTsの皮下埋め込み試験の結果は、きわめて軽い炎症が短期間生じるだけで、すぐに炎症は鎮静化することから、使用部位さえ適切であれば慢性炎症が持続するとは考えられない[58]。発癌性で注意すべき点は、CNTsに含まれる不純物や化学的修飾分子が発癌性を有する場合であろう。

実際には、生体材料としてのin vivoの発癌性を評価する試験は、CNTsのような粒子物質だけでなく、bulkの生体材料についても、現在明確には確立していない。そこで我々は、生体材料の新しい発癌性試験モデルとして、CNTsを遺伝子改変発癌性マウスの皮下に埋め込む評価方法を開発した[98]。結果は、CNTsを埋め込んでも全く発癌することはなかった。この遺伝子改変発癌性マウスの実験については、5-4-7章で詳しく解説する。

3-5 酸化ストレス

酸化ストレスはアポトーシスや発癌性と関連するため、毒性の大きな指標になる。CNTsが酸化ストレスを誘導するか否かは、意見が分かれるところである。In vivoにおいて、CNTsによる酸化ストレスのマーカースの変化が報告されている。例えばSWCNTsの静脈内注射は、肺と肝臓に高いレベルの酸化ストレスマーカースを誘導した[312]。Antioxidant vitamin E を用いた研究では、SWCNTsは酸化ストレスの誘導に大きな役割を担っていると報告された[337]。このように、SWCNTsは酸化ストレスを誘導しやすいという報告が散見される[191]。一方MWCNTsは、マウスの静脈内に注射したところ、肝臓や脾臓の遺伝子発現解析で酸化ストレスマーカースであるNAD(P)Hの有意な上昇を示したという報告がある[338]。しかし現時点では、MWCNTsはあまり酸化ストレスを誘導しないという見解が多い[339-341]。酸化ストレスの誘導が、CNTs本来の性質によるものであるとすれば、現在そのメカニズムは明確になっていない。CNTsに残存する金属触媒が酸化ストレスを誘導する可能性が指摘されている。これらの点については、4-2-1章で、細胞に焦点を当てて再度検討する。

3-6 生体分解性

CNTsの生体分解性は、現在トピックスの研究テーマである。以前臨床でアキレス腱補強に用いられたカーボンファイバーは、長期間経過すると体内で分断されることが明らかになっている。これはカーボンファイバーが生体内で分解した結果と考えられる[96]。

生体材料において、その物質がどの程度の生体分解性を持つかということは、毒性において重要な意味をもつ。生体分解性が高い材料の場合には、分解産物の毒性も評価しなければならない。一方で、生体内ですぐに分解してしまうのであれば、最初の形状から危惧される発癌性などの毒性は、問題にならなくなる。2008年にAllenらが、CNTsが生体分解性を示す可能性を示した[342]。その後も、CNTsにはわずかながら生体分解性があることが報告されており、今後の研究の発展が期待される[343-348]。しかし、CNTsに生体分解性があるにしてもその分解速度はきわめて遅いため、CNT 1本を単独で使用するような特殊な場合を除いて、生体材料としての安全性に大きな影響を与えることはないと考えられる。

3-7 その他のin vivo試験

in vivo研究には、CNTsの脳や脊髄における取り込みと毒性も含まれる。CNTsの中枢神経系への移行、特に脳への移行は現在大きな注目を集めている[349]。脳疾患や脊髄疾患の治療にCNTsを応用する研究は、新しいDDSとして、今後の発展が期待されている。このため、CNTsをマウスの脳や脊髄へ注入することに

より、神経適合性の評価などが行われている[70]。しかし、CNTsと中枢神経系の反応に関する研究は、まだきわめて初期の段階である[99, 350]。

その他にも、CNTsがアレルギー反応を引き起こすという報告がある[351]。また、CNTsが感染症を悪化させるとする報告もある[352, 353]。さらにSWCNTsが、微小循環において血小板を活性化させ血栓形成を加速するという報告もある[354]。これらの生体反応は、CNTsを生体材料に応用する際には重要であり、今後十分に検討すべき項目である。

また、ごく最近ナノ粒子に付着するタンパクが、ナノ粒子表面を部分的に覆いかくし、生体内の標的とする部位で十分な活性を生じることができない可能性が報告されている[355, 356]。これは”protein corona”と呼ばれ、4 - 3章で再度検討する。

3 - 8 小動物とヒトの体の大きさの違い

医学研究において、常に気を付けなければいけないことは、動物実験の結果が臨床の結果と異なる可能性がある点である[357-360]。これまでのほとんどの動物実験は、小動物で行われてきた。小動物のin vivo試験で示されたCNTsの毒性評価が、より大きな臓器をもつ人でも再現されるかは不明である。特に小さな粒子物質については、これまでに議論されていない。体が大きくなれば小さな粒子の毒性は取るに足らないものになる可能性がある。反対に、各臓器のより細かい構造への影響が、毒性を増加させるかもしれない。

動物の大きさによる血管の太さの違いは、CNTsの体内動態の結果を変える可能性がある。ほとんどの血管はヒトの方が小動物よりも太い。しかし、最末端の微小血管の太さと構造は動物種によって大きくは変わらないと考えられる。すると、CNTsが組織から血流に移行したり、血流に乗ったCNTsが血管を閉塞したりする現象は、小動物で十分に再現が可能である。よって、生体内動態試験は小動物で問題がなければ、ヒトでは中枢の血管が太い分だけ、より安全であるとみなすことができる。CNTsをDDSやイメージングで血流に乗せる場合には、動物の大きさの違いによる生体内動態の違いを十分考慮する必要がある。

一方、小動物でもヒトでも細胞の大きさは変わらないので、CNTsと細胞の関係は変わらず、細胞そのものへの影響はほとんど変わらない。このため、小さな粒子物質であっても、動物実験における基本的な生体反応の結果は、再現性が高いと考えられる。

これらの動物の大きさの違いについては、イヌなどの大型動物で試験を行い、小型動物との差異を検討することである程度解明される可能性があるが、実験条件を一定にすることは困難であり、多様なCNTsを大型動物で評価することは現実的には不可能である。すでにISOなどで定められた一般の生体材料と同様に、

小動物の評価で問題がなければ、臨床応用に踏み出すことが合理的である。しかし、副作用の評価においては、他の新しい生体材料と同様に、動物実験と差異が生じる可能性があることを常に考慮しておく必要がある。

4. CNTsを生体材料に使用するためのin vitro 毒性試験の現状

CNTsを生体材料に応用するためのin vitroの毒性評価では、吸入毒性のための細胞を使用した試験データをかなり適用することができる[361-365]。特に論文数が多い吸入毒性のためのマクロファージに関する研究は、CNTsを生体に埋め込んだ際にも重要な役割を担う細胞であるため、生体材料の毒性評価にも適用することができる[155]。

CNTsのin vitro 試験では、薬物などの化学物質と異なり、独特の性質を有するナノサイズの粒子物質であるために、注意しなければならない点が多い。例えば、CNTsは本来水に溶けない疎水性物質であるため、培養実験には分散剤として界面活性剤などを使用する必要がある[329]。この分散剤の化学的性質が、CNTsの毒性を変えるという報告がある[366-371]。また、CNTsが培養液のリン脂質やアルブミンを吸着し、それを細胞が認識して反応する可能性が指摘されている[372-374]。さらに、CNTsと検査試薬が反応してしまう可能性もあり、注意する必要がある[91, 191]。またCNTsは光を吸収するため、光を用いた測定方法は適していないという報告もある[375-377]。これらの混沌とした条件が、in vitro 研究の結果に影響し、その解釈を困難にしている。

4-1 CNTsの細胞内への取り込み

CNTsの細胞内への取り込みについては、多数の研究者が、様々な細胞で観察している。しかし、結果は研究によって大きく異なる。SWCNTsとRAW264.7に限ってみても、細胞内に取り込まれるという報告と取り込まれないという報告がある[340, 364, 372, 378]。Firmeらは、CNTsが様々な細胞の細胞膜を通過するメカニズムを、endocytosis/phagocytosisとnanopenetrationに分けて検討している。endocytosisは細胞による小さな細胞外粒子（100nm以下のサイズ）の能動的な取り込みであり、phagocytosisは比較的大きな粒子に対する免疫細胞系の好中球、マクロファージ、dendritic cellsなどにみられる能動的な取り込みである[91]。一方、nanopenetrationは受動的な取り込みであり、化学的修飾や分子を吸着したCNTsは、細胞に認識され、nanopenetrationによって取り込まれやすくなるという見解がある[75, 107, 157, 379-384]。

我々は、pristineのCNTsを用いて細胞内への取り込みを調べ、細胞や分散剤の種類によって全く異なることを報告した。さらに、免疫細胞以外の細胞も積極的にCNTsを取り込み、endocytosis/phagocytosisがCNTsの取り込みに重要であるのに対し、nanopenetrationはあまり関与しないことを報告した(図6)[385, 386]。Yaronらも同様に、penetrationによるSWCNTsの細胞内への取り込みを否定している[387]。CNTsを取り込まない細胞でも細胞表面への接着は観察されており、

CNTsを細胞に接着させる分子と細胞内へ取り込む分子が共通しているかは不明である。一方、CNTsの細胞内への取り込みに細胞膜タンパク質が関与していることが報告されている[384, 388]。さらにこれらの膜タンパク質は、CNTsと特異的に結合する可能性が示されている[80, 389]。しかし、この膜タンパク質とCNTsの結合においても、タンパクを含む分散剤の影響を検討しなければならない[369, 371, 385]。最近、電磁波を照射するとCNTsが細胞内に入りやすく、特に核内に取り込まれやすいと報告された[390]。このように、CNTsの細胞内への取り込みの現象そのものが未だに混沌としており、そのメカニズムの解明には至っていないのが現状である。

このようなCNTsの細胞内への取り込みを明らかにするために、これまでに様々なmonitoring methodsが開発されてきた。例えば、light scattering analysisによって、CNTsの細胞内取り込みを定性的に評価する方法が報告された。また、fluorescence detectionを利用して、CNTsの細胞輸送が詳細に調べられた。細胞を適切に調製することにより、透過型電子顕微鏡（3-D dark-field scanning transmission electron microscopy）を用いて、細胞内のCNTsの超微細局在を確認した[368, 391-393]。これらの様々な方法を駆使して、CNTsの細胞への取り込みや細胞内の挙動を追跡することができれば、CNTsと細胞の反応がより詳細に明らかになる。CNTsが細胞内に取り込まれるメカニズムと細胞内での挙動は、細胞毒性だけでなく、CNTsをDDSに使用した際の薬物動態にも重要な意義を持つため、さらに多くの研究が行われることが期待される。

4-2 細胞毒性のメカニズム

CNTsの細胞毒性についても、多くの研究結果が報告されている。以前は、マクロファージなどの細胞毒性がアスベストと同等に高いという報告もあったが[75, 76, 394]、近年はCNTsの細胞毒性は低いという報告が多い[155]。このようなin vitroの細胞毒性試験を検討する場合に注意しなければならないことは、CNTsはどの細胞を用いてもある一定以上の濃度では、その細胞数を濃度依存性に減少させるということである。CNTsが生体にとって異物であり、粒子物質として細胞に接触すれば、生きている細胞としては当然の反応である。問題はCNTsの細胞毒性の程度が、生体に安全な物質と比較して高いか低いかということである。

さらに注意しなければならないことは、細胞毒性試験を行う目的である。CNTsを生体材料に応用するための安全性評価が目的である場合、多くの報告で細胞毒性が指摘されている $\mu\text{g/ml}$ レベルの濃度は、現実的にin vivoで起こる濃度よりはるかに高い。現実的に起こらない高い濃度での細胞毒性試験の結果は、必要以上に毒性が強調されることになる。むしろ、安全性評価の視点に立てば、細

胞毒性を示す濃度の下限値を検出することに意義があり、この下限値が生体内で起こりうる濃度かどうかを検討することが重要である。

また、同じナノ粒子でも、細胞によって反応が全く異なることは十分に認識しておくべきである。これは、近年”cell vision” effectと呼ばれている。この”cell vision” effectを探究することにより、細胞毒性が生じるメカニズムの解明が可能になる。Mahmoudiらは、この細胞種差の細胞毒性メカニズムを明らかにしてナノ粒子のdetoxificationの検討を行っている[396, 397]。

いずれにしろ、CNTsを生体材料に応用するためには、生体にとって細胞毒性は低い方がよく、そのメカニズムを探究することにより、より細胞毒性の低いCNTsの製造方法や使用方法などを明らかにすることができる。このCNTsが細胞毒性を示すメカニズムについて様々な研究が進められている[156, 398, 399]。

4-2-1 酸化ストレス

in vivoと同様にin vitroの毒性評価でも、酸化ストレスの影響が注目される。CNTsが細胞毒性となる酸化ストレスを誘導するという報告もあれば、誘導しないという報告もある[400]。この酸化ストレスによる細胞毒性は、CNTsを製造時に使用する触媒金属（Fe, Co, Niなど）の遺残と大きく関連している。CNTsに含まれる金属の割合が高くなれば、細胞毒性が高くなるという報告が多い[72, 368, 401, 402]。CNTsのある製品では、これらの金属不純物の重量比が10%以上を占めることもあり、free radicalを生じてoxidative speciesになり、酸化ダメージを組織に与える[263, 400, 403]。このような過程はCNTsがマクロファージに貪食されてからも生じる。例えばNADPH oxidaseが細胞内で活性化され、高いsuperoxide radicalがバクテリアなどを殺す。Feの遺残は、過酸化物を活性hydroxyl (OH-) radicalを作る。その結果酸化ストレスにより細胞のタンパク、脂質、DNAが障害される。Coの遺残はchromosomeの障害を生じる。しかし、Niの細胞障害は示されていないという報告があり、これについては更なる検討を要する[75, 290, 404]。さらに、CNTsの凝集が酸化ストレスを誘導するという報告もある。Shvedovaらは、CNTsの細胞毒性は、多くの相反する結果が出ているが、きちんとした測定方法で、きちんと分散させ、金属不純物による酸化ストレスを取り除けば、in vitroの細胞毒性はかなり低いであろうと述べている[155]。我々も遺残鉄の少ないCNTsの酸化ストレスの量は、細胞増殖性や炎症反応と相関性がないという結論を得ている[386, 405]。また、金属不純物の全くないカーボンナノチューブの1種であるカーボンナノホーンの細胞毒性は、道路を舗装する際に生じる粉塵の細胞毒性の10%以下で、極めて安全であるという報告もある[406]。しかしCNTsに全く金属不純物が存在しないことは現実的ではない。このため、金属不純物がどの程度の量であれば酸化還元特性を左右しないのかを考察した論文がある

[407]。また、金属不純物による酸化に影響を受けやすいCNTsを解析した論文もある[408]。いずれにしろ酸化ストレスの誘発という観点からは金属不純物は少ない方がよく、これまでの報告を総合すると、現時点では炭素純度が99 %以上であれば問題がないと判断することができる。

一方、CNTsが細胞に取り込まれる時に、長い線維は取り込みきれずに、酸化ストレスを誘導するという可能性が以前より指摘されてきた[281]。この現象は、*frustrated phagocytosis*と呼ばれている。最近の報告でも、一定の長さより短いCNTsはきちんと取り込まれるが、長いCNTsはこのメカニズムによる毒性を生じると述べている[409-412]。CNTsを吸い込んだ時に、胸腔でこの*frustrated phagocytosis*による持続する炎症が長期間続くと、発癌等の重篤な問題が生じる可能性が指摘されている(図7)。CNTsを生体材料に応用する場合の、*frustrated phagocytosis*による細胞毒性について、6-2-2で考察する。

2012年9月には、米国のNational Institute of Standards and Technology (NIST)から、SWCNTsに酸化ストレスからDNAを保護する効果があるというこれまでと全く異なる結果が報告された[413]。このように酸化ストレスについては一定の結論が得られていないが、現在、様々な細胞や様々な条件で行われた研究を総合すると、CNTsの凝集性や長さに一定の制限があるが、その制限を超えないものであれば、CNTsそのものは酸化ストレスを誘導しないというのがほぼ一致した結論である[155]。また最近の研究では、長いCNTsでも、トリエチレングリコール等で化学的に処理をすることで、生体液中で凝集しにくくなり、毒性を大きく軽減することが可能なことが示された[414]。

4-2-2 免疫への影響

第二の問題点は、CNTsの免疫担当細胞に対する反応である。免疫担当細胞は、CNTsが生体内に入った時に、多くの場合最初に反応して細胞内に取り込み、生体反応を引き起こす細胞であり、生体内で最もCNTsの安全性に関与する細胞である。もちろんpristineのCNTsには抗原提示となるタンパクがないため、単なる異物としての免疫反応しか生じない。すなわち局所での炎症が持続しなければ、免疫反応は鎮静化するはずである。しかし、ナノサイズであるために免疫担当細胞に取り込まれること、繊維状という形態のため細胞に取り込みきれないこと、遺残金属の化学的な特性などが炎症を持続させることなどの可能性があり、CNTsに対する免疫担当細胞の反応を明らかにすることが必要である。現時点の*in vitro*研究においては、純度が高く、あまり長くないCNTsは、免疫担当細胞の反応を生じないという報告が多い[155, 415]。例えば、CNTsはマウスマクロファージ (RAW 264.7細胞) やマウス骨髄由来樹状細胞 (bmDC) などの抗原提示細胞 (APC) には著明な免疫学的影響を及ぼさなかった[416]。また、CNTsそのも

のはマクロファージにおいて、炎症性サイトカインを誘導しないが、遺残金属が誘導するという報告がある[85, 401, 402]。CNTsが免疫担当細胞の標的にならないことが明らかになれば、生体材料としての安全性が高い大きな根拠となる。もちろん、pristineなCNTsが自己免疫疾患を引き起こすことは、論理的にありえない。

4-2-3 細胞毒性を軽減する試み

前述したように、CNTsによる細胞毒性をできるだけ少なくする手法が検討されている。例えば、ナノコンビナトリアルライブラリーアプローチを用いてCNTsの細胞毒性を軽減することが提言されている。これは、CNTsの化学的修飾によって物理化学的特性が著しく変化し、それにより生物学的活性が変化することを利用したものである。80種類の表面修飾ナノチューブからなるライブラリについて、タンパク質結合能、細胞毒性、免疫応答に関して、スクリーニングを行った。この手法により、タンパク質結合能、細胞毒性、免疫応答が低く、生体適合性の高いナノチューブを選択することができた[417]。また、CNTsの形状によって細胞毒性が表れないことや[309, 418]、CNTsを製造する時の黒鉛化温度を変えると生物学的活性が大きく変化すること[405]も明らかになっており、細胞毒性の最小化が十分期待できる。そのためにも細胞がCNTsを認識するメカニズムとCNTsの物理化学的性質による異なる細胞毒性への影響を明らかにする必要がある。

4-3 CNTsとタンパクの相互作用

CNTsが生体内で応用される環境下においては、必ずCNTsはタンパク質に晒されることになる。このため、CNTsへのタンパクの吸着と、タンパクが吸着したCNTsの生体反応の変化、すなわちCNTsとタンパクの相互作用を知る必要がある。現在CNTsの機能化のためにペプチドやタンパクである抗体やレセプターを用いた技術開発が多数行われているが[176, 420, 421]、まずpristineのCNTsに対するタンパクの影響を調べるべきである。血液中のタンパク質に対するCNTsの吸着性はランダムではなく、fibrinogen、apolipoproteins、アルブミンに高い選択性が示されている[422]。このCNTsに吸着性のあるアルブミンは、実験で用いられるCNTsの分散剤の大多数に含まれているため、CNTsの毒性評価がpristineなCNTsを評価しているのかアルブミンを吸着したCNTsを評価しているのかを検討する必要がある[366-368, 370]。Geらは血漿タンパクであるfibrinogen、 γ -globulin、transferrin、BSAのSWCNTsへの吸着様式をatomic force microscopeで観察し、これらのタンパクの結合によってSWCNTsの細胞毒性が減少したと報告した[423]。しかし、この実験に使われているSWCNTsはCr、Fe、MO、COなど多くの金属残

留物が含まれており、この影響も考慮しなければならない。

近年、様々なタンパクによってナノ粒子表面が覆われる現象は、“protein corona”と呼ばれている[424]。このprotein coronaには、temperature, protein concentration, gradient concentration, protein source and physicochemical properties of nanoparticles など、多くの要素が影響を与えている。また、protein coronaは細胞や生体の反応に重大な影響を与えていることが報告されている。例えば、protein coronaがナノ粒子表面の一部を遮蔽することにより、細胞や生体に対する活性を十分に発揮できなくなることが指摘されている[355, 356, 425-429]。CNTsにおいても、このprotein coronaが、生体内でのCNTsの運命を決定しているかもしれない。また、protein coronaによる表面の変化は、化学修飾したCNTsの効果にも影響を与える可能性がある。Shannahanらは、未修飾と修飾したSWCNTsおよびMWCNTsのそれぞれのprotein coronaの構成タンパク質を比較し、SWCNTsとMWCNTsで違いがあることや、COOH基修飾によって構成タンパク質の種類が増えることを報告している[430]。化学修飾したナノ粒子の機能の減弱が相次いで示されており、CNTsでも同様の現象が生じるかの検証を、早急に行う必要がある。

一方ごく最近、CNTsとタンパクが結合すると細胞毒性が低下する理由として、人類がすでに無数のナノ粒子に晒されており、ナノ粒子に対してヒトの防御機構が発達してきたため、タンパク結合を介する一定の生体システムが確立しているという新しい視点からの報告がある[431]。CNTsによって、これまで不明であった生体の防御機構が解明される可能性があり興味深い。

4-4 CNTsの突然変異誘発、遺伝毒性、アポトーシス誘発

CNTsの突然変異誘発や遺伝毒性の評価も、安全性に関するin vitro研究の重要なテーマである[432-441]。これらの評価結果は、CNTsの発癌性に大きく影響するからである。現在主として行われている試験は、Aims試験、コメットアッセイ、小核試験などである。

Aims試験は、アミノ酸合成ができないように改変した細菌が、突然変異により細菌が本来有しているアミノ酸合成ができるように復帰する現象を定量化するもので、復帰突然変異試験とも呼ばれる。Salmonella typhimuriumなどを使用したAims試験は、SWCNTs、MWCNTsともに突然変異の誘発は認められなかったとする報告が多い。哺乳類の細胞を用いても突然変異の試験が行われ、Chinese hamster肺線維芽細胞（CHL/IU）でも、MWCNTsによって突然変異の頻度は変わらなかった[438, 442-445]。

コメットアッセイは、個々の細胞におけるDNA損傷を検出する技術であり、誘導されるDNAレベルの初期障害、修復動態、残存障害についてそれぞれ測定することができる。このため、様々な細胞を用いてSWCNTs、MWCNTsともに

コメットアッセイが行われている。結果は、CNTsがDNA損傷を誘発するという報告と誘発しないという報告が混在している。CNTsによるDNA損傷が認められた場合には、活性酸素（ROS）と関連するという見解が多い[446-449]。

小核試験は動物の赤血球あるいは他の細胞等を使い、被験物質を投与した時、遺伝子に生じた切断が修復されずそのまま残るために生じた小核を観察するもので、遺伝子損傷の指標になる。小核試験も様々な細胞を用いて、SWCNTsおよびMWCNTsが評価され、結果は陽性とするものと陰性とするものがある[399, 404, 442]。

アポトーシスの誘発に関する研究もあり、CNTsはマクロファージなどの細胞周期に作用してアポトーシスシグナルを誘導するという論文もあれば、全くアポトーシスを誘導しないという論文もある[318, 378, 450-452]。CNTsを取り込んだ多くの細胞は、細胞周期のG1期を停止することを示したという報告もある[430]。我々は、鉄が多く含まれるMWCNTsでアポトーシスと異なる細胞死が多いことを報告した[453]。一方、純度の高いMWCNTsを使った実験では、アポトーシス様の細胞死が認められ、CNTsに含まれる不純物が、アポトーシスに大きく影響すると考えられた[386]。

以上のように、CNTsは突然変異誘発や遺伝毒性を示すという結果と、示さないという結果が入り混じっている[89, 432, 437, 443, 454-456]。同じ試験を行っても、細胞によって異なる結果が得られたという報告もある[442]。遺伝毒性を示す例でも、遺残した金属による酸化ストレスがDNAに影響するという説としないという説がある[457]。結局、行われている全ての試験が、薬物のような化学物質の遺伝毒性や突然変異を調べる方法で粒子物質を評価しているために、溶液への分散や使用量などの試験条件の相違やCNTsに含まれる不純物の量が、評価結果に大きく影響したと考えられる。現時点では、突然変異誘発や遺伝毒性による発癌性については注意が必要であるが、純度の高いCNTsに関しては決定的な証拠は示されていないという結論になる[155]。CNTsを取り込んだ細胞がアポトーシスに至るかは、細胞の種類も含めて、今後の検討を必要とする。

4-5 細胞のシグナリング

CNTsによって誘導される細胞のシグナリングについては、マイクロアレイやプロテオミクスを用いた研究が報告されている[458]。SWCNTsをhuman embryo kidney cellsに2日間暴露したマイクロアレイの結果から、cell cycleのG1期関連遺伝子であるcdksとcyclinsの減少とアポトーシス関連遺伝子の増加を示した[318]。またSarkarらは、SWCNTsをForkin cellsに暴露し、stress and toxicity arrayではHMOX1、HMOX2、ERCC4、HSPE1が2倍以上増加し、RT-PCRではATM、CCNC、DNAJB4、GADD45Aが2倍以上の増加を示した[459]。HiranoらはMWCNTsを暴

露した気管支上皮細胞のreporter gene assayを行い、MWCNTsは転写因子であるNF- κ Bを活性化し、MAP kinase pathway のp38、ERK1、HSP27のphosphorylation上昇と炎症性サイトカインを誘導することを報告した[369]。NF- κ Bの活性化は、Heらによって、マクロファージでも検出されている[460]。我々は、破骨細胞におけるMWCNTsの細胞内シグナリングへの影響を調べた。結果は、MWCNTsは転写因子NFATc1の核への移行を阻害することにより、破骨細胞の分化を抑制した[217]。このように、CNTsが細胞のシグナリングに及ぼす影響は、細胞の機能が変化するメカニズムを理解するために重要であり、今後のさらなる研究が必要である。

プロテオミクスによる研究はkeratinocytesとhepatoma cellsで行われており、どちらもmetabolism、stress、redox、cytoskeleton formation、apoptosisなどに関連するタンパク質が、複数変化していることが報告されている[461, 462]。我々はMWCNTsを取り込まないmonoblastic leukemia cellsを使って、細胞毒性が低い条件におけるプロテオミクス解析を行ったが、同様の機能のタンパク質の変化を確認した(表1) [463]。このような網羅的な細胞シグナルの解析は、細胞変化の概略を把握するのに適している[464]。今後は、CNTsが直接影響を与えるパスウェイの特定へと研究が進み、細胞毒性評価に大きく貢献することが期待される。

4-6 細胞の選択

これまでは、Raw細胞や線維芽細胞など、できるだけ一般的な細胞で研究が行われることが多かった[396, 397]。しかし、CNTsに対する細胞の反応は細胞によって異なりその細胞が所属する臓器によって特異性があると考えられる。例えば、CNTsの肝臓、脾臓、肺における細胞毒性を比較した研究では、CNTsの誘導する酸化ストレスにより、肝臓と肺では容量依存性に毒性が増加したが、脾臓では増加しなかった[465]。今後は、このような特異性が生じるメカニズムを探求しなければならない。また、CNTsの生体反応が細胞や臓器によって異なることから、CNTsを実際に臨床応用のためには、使用する部位の細胞を用いた毒性試験が必要である。

例えばCNTsを神経再生に応用するために、ヒト神経芽細胞腫細胞と一次マウスニューロンをMWCNTsに曝露して反応を検討し、細胞生存性、酸化ストレス、アポトーシスへの影響が検討されている[70]。また、CNTsが心臓の細胞に及ぼす影響も検討されている。これは、新生仔ラット心室心筋細胞のパターン形成された成長鎖において、CNTsが、興奮伝導特性、筋原線維構造、活性酸素種生成に及ぼす影響を調べたもので、ディーゼル排気粒子や二酸化チタンナノ粒子と比較して、CNTsの影響はもっとも軽かった[466]。骨組織再生の足場材として

CNTsを使用するために、我々は2-3-2で示したように、骨形成細胞である骨芽細胞と骨吸収細胞である破骨細胞への影響について詳細に検討している [217, 218]。

5. CNTsを生体材料に使用するための安全性評価のreference materials

CNTsを生体材料に応用するための安全性が不明なのは、これまでに述べてきたように、毒性試験の結果が一定しない、あるいは相反する結果が出るためである。その最大の理由は、これまで生体に安全なことが確認されている、ナノサイズの粒子物質のreferenceとなる物質がなかったことである。どのような生体材料であっても生体にとって異物であるため、生体に対して多かれ少なかれ何らかの毒性をしめす。問題はその程度であり、生体に安全なことが既に認められているreferenceを基準として毒性試験を実施しなければ、生物学的安全性を評価することはできない。

一例を挙げると、2010年に発表されたMWCNTsのヒト線維芽細胞における細胞毒性、遺伝毒性、アポトーシスを検討した一つの論文がある。陰性対照は、分散剤を混合した生理食塩水のみであった。結果は、MWCNTsによる用量依存的な毒性が示され、全用量群で陰性対照と比べて毒性があり、DNA損傷により細胞生存率が大幅に低下し、プログラム細胞死が誘導されることが明らかにされたとしている。このため、CNTsは毒性が高いと結論づけている。この研究のように、CNTsを作用させた場合と作用させない場合を比較して、CNTsの毒性を評価することが、科学的に誤りであることは明らかである。この研究で用いた分散剤を混合した溶液は、毒性評価のreferenceにはならない。この研究は、ただ実験系が機能していることを示しただけのことで、CNTsの毒性について何一つ結論することはできないのである。

これまで不明であった毒性研究のreferenceとして適切な物質を明らかにすることが最重要であることは、この分野の研究者達には十分認識されていることであり、すでに2009年にはNature Nanotechnologyの総説で、Kostarelosらによって明確に指摘されている[68]。CNTsを生体材料として用いるための生物学的安全性評価のreferenceとなる物質は、既に生物学的安全性が確認されているナノサイズの粒子物質でなければならない。評価する物質がこのreference materialと毒性が同等であるか、より低いことが明らかになれば、生体に安全であると決定できるからである。Positive controlのためのreference materialはあるにこしたことはないが、実施した実験系が機能しているかの判断は、これまでの化学物質でも代用が可能である。しかしこの重要な指摘が行われた後も、最適なnegative controlのためのreferenceは見出されず、CNTsの生体材料として安全性を決定することができないまま、現在に至っている。

5-1 CNTsにreferenceとなる物質がない理由

最適なreferenceを見出すことができない理由の第一は、CNTsのもつ多彩な性

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、例えば顆粒状ハイ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の生体材料やハイ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。