

平成21年 5 月 22日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791419

研究課題名（和文）

「親水性ナノカーボンの作成とその生体適合性・体内動態の検討」

研究課題名（英文）

Synthesis of a water-soluble nanocarbon and its biodistribution

研究代表者

阿部 薫明（ABE SHIGEAKI）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40374566

研究成果の概要：

本研究では、フラーレンやカーボンナノチューブ(以下、CNT)など炭素系ナノ微粒子の生体適合性検討の為、上記素材の親水化、体内での循環・滞留・排泄（体内動態）の可視化・追跡を試みた。化学的表面修飾により、生体へと投与可能なCNT分散液を作成し、この分散液をマウスへと投与、経過観察を行った。電子顕微鏡観察から各臓器へのCNTの到達が確認された。また体内動態可視化法の検討の為、走査型蛍光X線分析顕微鏡、核磁気共鳴撮像(MRI)法などを用いて無機粒子の体内動態の観測に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	0
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：生体適合性・体内動態・カーボンナノチューブ・マイクロ/ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

ナノマテリアルの人体への応用には、予め起こり得る生体反応とその条件の把握が必要である。しかし、ナノ粒子の挙動は細胞・臓器・人体と様々なレベルについて解明する事が必要である、また微細である事、体内への拡散により密度も低い事から検出が容易ではない。

本研究では、これらナノマテリアルのうち、生物への毒性の有無が明らかにされていないフラーレンやカーボンナノチューブといった炭素系ナノ微粒子（ナノカーボン）の体

内動態、生体適合性を確認する為に、実験動物に対してナノカーボンを投与し、生体への影響・循環挙動についての観察・分析を目的とする。更に、臓器への濃縮、体外排出などナノカーボンの体内動態の可視化を試みる。

2. 研究の目的

ナノマテリアルの一つであるカーボンナノチューブ表面に化学修飾を施すことにより、界面活性剤や親水性ポリマーなどの添加物の存在なしに生体に投与可能なナノ物質を作成し、その体内での生体への影響・循環

挙動について検討し、生体適合性・安全性を調べる。また、ナノカーボンを始めとするマイクロ・ナノ粒子の体内動態可視化の手法を比較・検討し、その目的に合った新規のナノカーボンの設計を行う。

3. 研究の方法

(1) 化学修飾により、ナノカーボン物質の親水性の向上を図ると共に、付与した官能基を足場として、体内動態追跡のトレーサーとなる分子の導入を試みる。

(2) 得られた親水性ナノカーボンを実験動物へと投与し、生体への影響、体内での循環・蓄積などの様子を観察する。

(3) ナノカーボンを始めとするマイクロ・ナノ物質の体内動態の追跡・可視化を行うための手法の検討を行う。

(4) 量子化学的手法を用いて、ナノカーボンと小分子との相互作用を解明し、体内動態可視化を目指した新規のナノカーボンの分子設計を試みる。

4. 研究成果

(1) 親水性カーボンナノチューブの作成と体内動態可視化のための化学修飾

始めに、体内への投与を可能とするためにカルボン酸過酸化物による CNT の表面修飾を行い、数百 mg/L 程度で水中に安定に分散するカルボキシル化 CNT を作成した(図 1)。

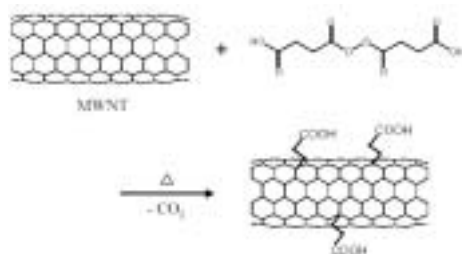


図 1 親水性 CNT の合成スキーム

この化学修飾により、CNT の親水性の向上と共に二次的な化学修飾が可能となった。そこで蛍光色素、および磁性錯体の付加を試みた。図 2 は、fluoresceine を結合した CNT の蛍光スペクトルを示している。蛍光色素のスペクトルと比較して、ピークの長波長シフトおよびブロード化がみられ、ラベル化反応の進行を示唆していると考えられる。磁性体によるラベル化については、現在反応結果の確認中である。

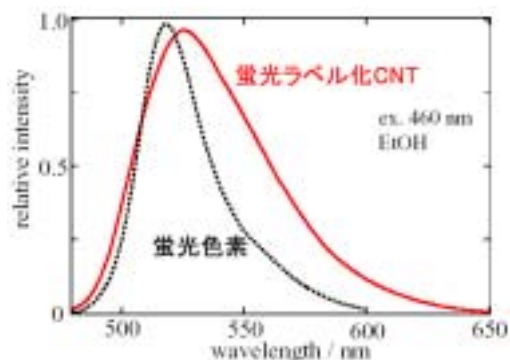


図 2 蛍光ラベル化 CNT の蛍光スペクトル

(2) 親水性 CNT の体内動態の追跡

ナノカーボンの体内動態を追跡するために、1) にて得られた親水性 CNT をマウス尾静脈から投与した。経過観察 (1d-4w) の後、肺・肝臓・腎臓・脾臓を摘出し、ホルマリン固定後に TEM にて観察を行った。投与 1d 後において、肺からは CNT が観察された。1w では肺のみならず肝臓への到達も確認された。4w には僅かに脾臓からも検出された。図 2 は、経過観察 4w 後の肺の TEM 像である。また今回の実験条件では、腎臓への到達は確認されなかった。今回の結果から、尾錠脈より血中に投与された親水性 CNT は始めに肺に到達・一時的に滞留し、徐々に肝臓・脾臓などの臓器へと移行していくと考えられる。またこれらの観察期間中にマウスの体調の悪化はみられなかった。今後は個体数を増やし、より詳細な観察、組織などへの影響についての検討により、CNT の生体適合性、為害性の有無が解明されると考えられる。

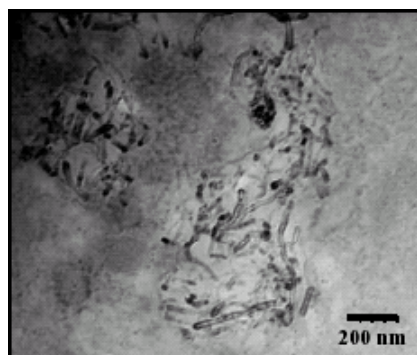


図 3 親水性 CNT 投与後 4 w のマウス肺の TEM 像

(3) 体内動態可視化法の検討 走査型 X 線分析顕微鏡

図 4 は走査型 X 線分析顕微鏡により、尾静脈から投与した TiO_2 マイクロ粒子の体内動態を可視化したものである。投与直後 (a) には肺のみから TiO_2 の信号が検出されたが、時間経過に伴ない肝臓からも信号が検出

され、その強度が経時的に増大した(b)。一方、肺からの信号強度は減少がみられた。1w後には、肺からの信号は殆ど検出されず、肝臓のみから TiO_2 の信号が検出された(c)。また脾臓への TiO_2 も到達も確認された。マウス体内へと投与されたマイクロ粒子は一旦肺へと到達し、その後、肝臓や脾臓など他の臓器へと循環していくことが示された。またその挙動は粒子の化学種やサイズにより変化する事も明らかになった。図5は、a) Pt ($1\mu m$) b) TiO_2 ($1\mu m$) c) TiO_2 ($0.5\mu m$) を投与したのちの肺・肝臓・脾臓での存在比を経時的に示した結果である。Ptの場合、肺に到達した後、速やかに他の臓器への移行が観測された。一方、同じサイズの TiO_2 の場合、数十時間の肺への滞留のち、他の臓器へと移行する様子が確認された。更に小さな粒径 ($0.5\mu m$) の TiO_2 の場合、肺への滞留時間の短縮・多臓器への速やかな移行が確認された。

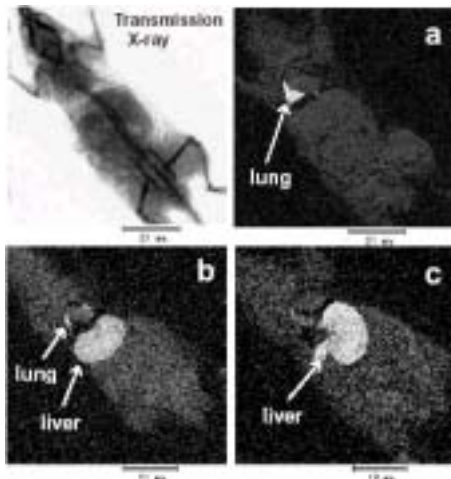


図4 TiO_2 マイクロ粒子投与後のマウス(全身)のX線透過像(左上)とXSAM像
a) 投与直後、b) 1d、c) 1w

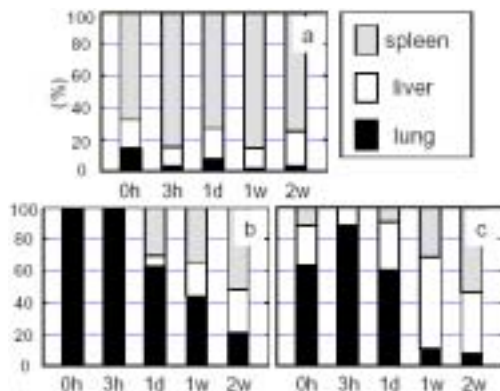


図5 マイクロ粒子体内分布の経時変化
a) Pt ($1\mu m$)、b) TiO_2 ($1\mu m$)、
c) TiO_2 ($0.5\mu m$)
核磁気共鳴撮像法

図5はナノサイズのマグネタイトの体内動態を核磁気共鳴撮像(MRI)法により可視化したものである。麻酔下のマウスの尾錠脈を確保し、ナノマグネタイト投与前後のMR(T2強調)画像を撮像した。経時変化を観察するために、投与直後から30min、毎に2時間まで、および1週間後にも撮像を行った。投与直後より、徐々に肝臓、腎臓、脾臓において輝度の低下が見られた。この輝度の低下は、マグネタイトの存在による緩和時間の変化によるものであり、各臓器内で見られた輝度の低下は当該臓器へのマグネタイトの到達・滞留を示唆するものである。

このMRI法の使用により、非侵襲的な体内動態の可視化が可能である。つまり、被験物質を投与した同一個体について、経時的な観察が可能となり、また体内の3次元情報も得られる為、マイクロ・ナノ粒子の体内動態の追跡・可視化に対して有効な手法であると考えられる。

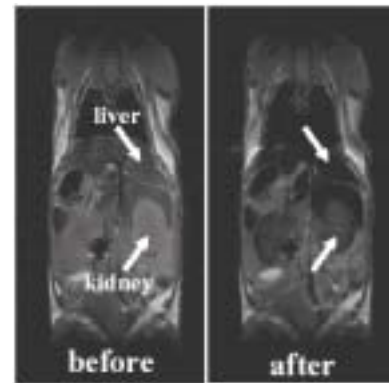


図6 ナノマグネタイト投与前後のマウスのMRI像

3) 磁性カーボンナノチューブの設計のための理論計算

CNTなどナノカーボンの体内動態可視化法の一つとして、MRI法は有効な手段である。しかし、MRIによる追跡・可視化のためには標的となる化合物を磁性ラベル化する必要がある。その分子設計のため、磁性物質(マンガンイオン(Mn^{2+}))とグラフェンシートとの相互作用の違いによる電子状態の変化を分子軌道計算により評価し、結合状態の違いがMR信号に及ぼす影響を理論的に予測した。その結果、結合サイトの違いにより、超微細結合定数が10-100 mTまで大きく変化した。この結果は Mn^{2+} を指標とする事によりナノカーボン中での結合の変化の捕捉が可能である事を示唆している。

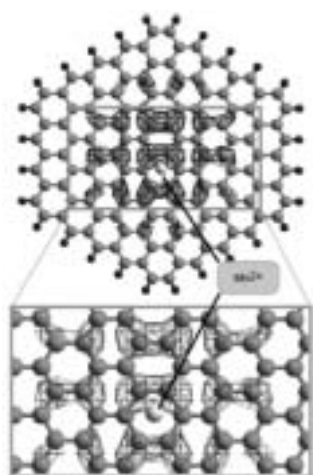


図7 拡張 Huckel 法による Mn^{2+} -
グラフェン相互作用系での電子密度

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計17件)

S. Abe, C. Koyama, M. Uo, T. Akasaka, Y. Kuboki and F. Watari, "Time-dependence and visualization of TiO_2 and Pt particle biodistribution in mice", *J. Nanoscience Nanotechnology*, 9, p4988-4991, 2009、査読有

S. Abe, F. Watari, T. Takada and H. Tachikawa, "A DFT and MD study on the interaction of carbon nano-materials with metal ions", *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 505, p51-58, 2009、査読有

S. Abe, C. Koyama, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, and F. Watari, "Internal distribution of several inorganic microparticles in mice", *Key Engineering Materials*, 396-398, p539-542, 2009、査読有

S. Abe, I. Kida, M. Esaki, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, B. Jeyadevan, Y. Kuboki, M. Morita, K. Tohji, and F. Watari, "Biodistribution imaging of magnetic nanoparticles in mice compared with X-ray scanning analytical microscopy and Magnetic Resonance imaging", *Bio-Medical Materials and Engineering*, (in press) 査読有

S. Abe, C. Koyama, M. Esaki, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, M. Morita, and F. Watari, "In vivo internal diffusion of several inorganic microparticles through an oral

administration", *Bio-Medical Materials and Engineering*, (in press) 査読有

M. Terada, S. Abe, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kitagawa, and F. Watari, "Development of a multiwalled carbon nanotube coated collagen dish", *Dental Material J.*, 28, p82-88, 2009、査読有

X. Li, H. Gao, M. Uo, Y. Sato, T. Akasaka, S. Abe, Q. Feng, F. Cui, and F. Watari, "Maturation of osteoblast-like Saos2 induced by carbon nanotubes", *Biomedical Materials*, 4, p15005-15012, 2009、査読有

F. Watari, S. Abe, I. Rosca, A. Yokoyama, M. Uo, T. Akasaka, N. Takashi, Y. Totsuka, E. Hirata, M. Matsuoka, K. Ishikawa, S. Itoh and Y. Yawaka, "Visualization of invasion into the body and internal diffusion of nanoparticles", *Key Engineering Materials*, 396-398, p569-572, 2009、査読有

F. Watari, N. Takashi, A. Yokoyama, M. Uo, T. Akasaka, Y. Sato, S. Abe, Y. Totsuka, K. Tohji, "Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects", *J. Royal Society Interface*, 6, pS371-S388 (2009)、査読有

M. Terada, S. Abe, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kitagawa, and F. Watari, "Multiwalled carbon nanotube coating on titanium", *Bio-Medical Materials and Engineering*, (in press) 査読有

T. Akasaka, A. Yokoyama, M. Matsuoka, T. Hashimoto, S. Abe, M. Uo and F. Watari, "Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2) to carbon nanotube sheets", *Bio-Medical Materials and Engineering*, (in press) 査読有

S. Abe, T. Fukuzumi, and H. Tachikawa, "Ab-initio calculations on the structures and electronic states of dimethylsulfide-water clusters", *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Metal Chem.*, 38, p105-110, 2008、査読有

H. Nakagawa, M. Ohira, S. Hayashi, S. Abe, S. Saito, N. Nagahori, K. Monde, Y. Shinohara, N. Fujitani, H. Kondo, S. Akiyama, A. Nakagawara, and S. Nishimura, "Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system", *Cancer Letters*, 270, p296-301, 2008、査読有

F. Watari, S. Abe, C. Koyama, A. Yokoyama, T. Akasaka, M. Uo, M. Matsuoka, Y. Totsuka, M. Esaki, M. Morita, and T. Yonezawa, "Behavior of in vitro, in vivo and

internal motion of micro/nano particles of titanium, titanium oxides and others”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 116, p1-5, 2008、査読有

M. Uo, K. Asakura, K. Tamura, Y. Totsuka, **S. Abe**, T. Akasaka, and F. Watari, “XAFS analysis of Ti and Ni dissolution from pure Ti, Ni-Ti alloy, and SUS304 in soft tissues”, *Chemistry Letters*, 37, p958-959, 2008、査読有

F. Watari, **S. Abe**, K. Tamura, M. Uo, A. Yokoyama, and Y. Totsuka, “Internal diffusion of micro/nanoparticles inside body”, *Key Engineering Materials*, 361-363, p95-98, 2008、査読有

H. Tachikawa and **S. Abe**, “Reaction dynamics following electron capture of chlorofluorocarbon adsorbed on water cluster: A direct density functional theory molecular dynamics study”, *J. Chem. Phys.*, 126, p194310-194319, 2007、査読有

[学会発表](計24件)

1. **S. Abe**, Y. Nagoya, F. Watari and H. Tachikawa, “A direct study on graphene-water interaction system”, 5th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics, 2009/3/17, (Miyazaki)
2. **阿部薫明**, 亙理文夫, 田地川浩人, “成層圏での氷上にトラップされたフロン化合物の光分解メカニズム”, 北海道支部2009年冬季研究発表会, 2009/2/3, (札幌)
3. 林大輔, **阿部薫明**, 石田智毅, 大和谷恵実, 赤坂司, 宇尾基弘, 亙理文夫, 高田知哉, “人工酵素モデルを用いた石灰化反応の制御”, 第21回代用臓器・再生医学研究会, 2009/1/31, (札幌)
4. **S. Abe**, Y. Nagoya, F. Watari and H. Tachikawa, “A DFT and MD study on the evaporation dynamics of water molecules on carbon nano-materials”, 8th International Conference on Nano-Molecular Electronics, 2008/12/16, (Kobe)
5. **S. Abe**, T. Yonezawa, C. Koyama, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, and F. Watari, “Internal distribution behavior of inorganic particles in mice”, 21st International symposium of microprocesses and nanotechnology, 2008/10/29, (Fukuoka)
6. **S. Abe**, C. Koyama, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, and F. Watari, “Biodistribution of several inorganic micro/nano particles in mice”, 21st International Symposium on Ceramics in Medicine (Bioceramics21), 2008/10/22, (Buzios)
7. **阿部薫明**, 亙理文夫, 高田知哉, 田地川浩人, “ナノカーボン物質と磁性金属イオン(Mn²⁺)との相互作用に関する理論的研究”, 平成20年度第2回分子科学討論会, 2008/9/26, (福岡)
8. 石田智毅, **阿部薫明**, 赤坂司, 宇尾基弘, 亙理文夫, “バイオミメティックポリマーによる石灰化反応の制御”, 平成20年度秋期第52回日本歯科理工学会学術講演会, 2008/9/21, (吹田)
9. **阿部薫明**, 小山千佳, 赤坂司, 宇尾基弘, 久保木芳徳, 亙理文夫, “マウス体内での投与粒子の分布・拡散挙動の可視化”, 平成20年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏期セミナー, 2008/8/24, (千歳)
10. **S. Abe**, F. Watari and H. Tachikawa, “A DFT and MD study on the interaction of carbon nano-materials with metal ions”, International Symposium on Multi-scale Simulation of Biological and Soft Materials, 2008/6/19, (Tokyo)
11. M. Esaki, **S. Abe**, T. Akasaka, M. Uo, T. Hosono, Y. Sato, B. Jeyadevan, Y. Kuboki, M. Morita, K. Tohji, and F. Watari, “Distribution imaging of magnetic particles in mice compared with magnetic resonance imaging and X-ray scanning analytical microscope”, International Symposium on “Nanotoxicology Assessment and Biomedical Application of Fine Particles and Nanotubes”, 2008/6/17, (Sapporo)
12. **S. Abe**, C. Koyama, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, and F. Watari, “Imaging of biodistribution of organic- / inorganic-particles in mice”, International Symposium on “Nanotoxicology Assessment and Biomedical Application of Fine Particles and Nanotubes”, 2008/6/16, (Sapporo)
13. **S. Abe**, C. Koyama, M. Esaki, I. Kida, I. Rosca, T. Akasaka, M. Uo, M. Morita, Y. Sato, B. Jeyadevan, Y. Kuboki, K. Tohji, F. Watari, “Determination of administered organic/inorganic particles in mice”, 8th World Biomaterial Congress 2008, 2008/5/31, (Amsterdam)
14. **阿部薫明**, 小山千佳, 江崎光恵, Iosif Rosca, 赤坂司, 宇尾基弘, 森田学, 久保木芳徳, 亙理文夫, “有機・無機マイクロ粒子の生体内での分布状態の可視化”, 平成20年度春期第51回日本顕微鏡学会学術講演会, 2008/5/21, (京都)
15. **阿部薫明**, 江崎光恵, 赤坂司, 宇尾基弘, 久保木芳徳, 亙理文夫, “各種マイクロ・ナノ粒子の生体内での分布状態の追跡とその可視化”, 平成20年度春期第51回日本歯科理工学会学術講演会, 2008/4/27, (横浜)
16. **阿部薫明**, 小山千佳, 江崎光恵, Iosif Danel Rosca, 赤坂司, 宇尾基弘, 森田学,

- 久保木芳徳、巨理文夫、マウス体内での有機・無機粒子の体内循環挙動の追跡、第20回代用臓器・再生医学研究会(北海道大学・札幌) 2008/2/2
17. **阿部薫明**、巨理文夫、田地川浩人、カーボンナノ材料と金属イオン(Mn²⁺)との相互作用に関する理論的研究、北海道支部 2008年冬季研究発表会、2008/1/30、(札幌)
18. **阿部薫明**、小山千佳、江崎光恵、I. D. Rosca、赤坂司、宇尾基弘、森田学、久保木芳徳、巨理文夫、第5回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会、2007/12/18、(名古屋)
19. **阿部薫明**、小山千佳、I. D. Rosca、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、巨理文夫、有機・無機微粒子の体内動態イメージング法の検討、各種マイクロ・ナノ粒子の生体内での分布状態の追跡とその可視化、第29回日本バイオマテリアル学会、2007/11/27、(吹田)
20. M. Esaki, **Shigeaki Abe**, I. Kida, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, F. Watari, Determination of administered magnetite nanoparticles in mice: Magnetic resonance imaging and X-ray scanning electronic microscope, International Dental Materials Congress 2007, 2007/11/24、(Bangkok)
22. **S. Abe**, C. Koyama, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, F. Watari, Visualization of distribution of inorganic micro/nano particles in mice using X-ray scanning electronic microscope, International Dental Materials Congress 2007 (Imperial Queen's Hotel・Bangkok) 2007/11/24
23. **阿部薫明**、小山千佳、I. D. Rosca、赤坂司、宇尾基弘、古月文志、久保木芳徳、巨理文夫” マウスに投与したマイクロ・ナノ微粒子の体内動態の可視化法の開発”、第4回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会、2007/8/1、(東京)
24. **阿部薫明**、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、巨理文夫、各種金属微粒子の体内動態のイメージング、平成19年度春期第49回日本歯科理工学会学術講演会、2007/5/13、(札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 薫明 (ABE SHIGEAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40374566