

生体に及ぼす微粒子のナノトキシコロジー効果

(Nanotoxicological effect of particles on biocompatibility)

学位論文内容の要旨

【緒言】

現在各分野で精力的に行われているナノテクノロジーの研究開発については、そのプラス面ばかりが強調されているが、ナノ・マイクロ微粒子が健康に及ぼす影響も検討する必要がある。また、生体親和性に優れ医療分野で広く応用されているバイオマテリアルも、過酷な生体内環境での使用により摩耗・溶出し、その微粒子やイオンが生体組織の炎症・壊死、インプラントの弛み、全身反応などを起こすことが知られている。

我々はナノトキシコロジーの研究を進める上で、ナノ・マイクロ微粒子が *in vitro* でヒト培養細胞（好中球・マクロファージ）を用いて評価する方法を確立し、さらに動物体内への擬似摩耗粉を埋入し、*in vivo* での微粒子の経時的な生体毒性評価を進めてきた。本研究では、材質・粒子サイズの違いが、微粒子化した材料の組織為害作用に与える影響を病理学的・生化学的に検討することを目的とした。

第一部 (Effects of Particle Size on Cell Function and Morphology in Ti and Ni)ではチタンの粒子サイズに依存した組織為害作用について、第二部・第三部 (Effects of Ceramic Micro/Nano Particle Size on Cell Function and Morphology・Pathobiological Response of Carbon nano-tubes and Micro/nano particles) ではチタンに加え二酸化チタンやカーボンナノチューブ(CNT)を用い、ナノ・マイクロ微粒子に対する *in vitro* での細胞および *in vivo* での組織の反応について、第四部 (Effects of Ti, Ni and Fe particles on Cell Function and particle size dependent cytotoxicity) ではチタン・鉄・ニッケルの各微粒子のサイズを同一に調整し、材料特異的な化学的效果と材料非特異的な物理的サイズ効果について検討した。

【材料および方法】

試料として金属（チタン・ニッケル・鉄）、セラミックス（二酸化チタン）、カーボンナノチューブ（CNT）の各微粒子を用いた。それぞれの微粒子を 50nm から 150 μ m までの各種サイズに調整した。

①in vitro で各微粒子とヒトまたはラットの生細胞を重量比もしくは粒子数／細胞数を同一にして混和し、生存率・LDH 活性・サイトカイン産生量・活性酸素産生量を測定し、細胞の形態変化を SEM(電子顕微鏡)で観察した。また、生細胞が反応する臨界寸法を測定することを目的とし、CNT を用い同様な生化学的アッセイを行った。

②in vitro での反応と比較するため、in vivo でラット皮下埋入試験を行い、経時的な周囲組織の変化を病理組織学的に検討した。

【結果および考察】

第一部 ～チタン微粒子に対する生体反応のサイズ依存性～

培養液中のチタンのイオン溶出量は ICP(誘導プラズマイオン質量分析装置)の測定限界以下であり、化学的効果は無視できた。in vitro で 3 μ m のチタン微粒子に対し細胞は著名なサイトカイン・活性酸素の産生を認めた。一方、10 μ m 以上のチタン微粒子に対しては細胞の反応は低下した。in vivo での動物埋入試験でも 3 μ m 粒子の周囲組織には強い細胞浸潤を認める炎症が観察された。しかし細胞障害性のあるイオンを溶出するニッケルとは異なり壊死組織は認めなかった。50 μ m 以上のチタン粒子は線維性結合組織で覆われマクロのチタンインプラントに近い反応で、in vivo でもサイズ依存性を示し in vitro の実験結果と良い相関を示した。生体親和性の高いチタンも 3 μ m の粒子になると細胞に取り込まれ、炎症や活性酸素の放出の原因となりうることが示唆された。

第二部 ～in vitro でのナノ・マイクロ微粒子に対する細胞の反応～

in vitro でのマイクロ微粒子に対する細胞反応にはサイズ依存性が認められ、細胞に取り込まれる 3 μ m-500nm では最大の反応を示した。生体内不活性の二酸化チタンもこの範囲ではチタン粒子と同様の傾向を示した。また、500nm 以下の粒子に対しても細胞は反応し、炎症性サイトカインや活性酸素の放出を検出し、細胞表面性状の変化を認めた。ナノ粒子に対して活性酸素・サイトカイン産生量は 3 μ m 粒子と有意差がなかったが細胞生存率は高かったことから、ナノレベルの CNT や二酸化チタン粒子には細胞刺激性はあるが細胞障害性は

低いことが示された。細胞に反応を起こさせない臨界寸法は 50nm より小さいサイズであることと 50nm の粒子も炎症の原因になりうることが示唆された。

第三部 ～in vivo でのナノ・マイクロ微粒子に対する組織の反応～

in vivo のラット皮下組織への埋入実験の結果から微粒子の組織への影響にはサイズ依存性があることが示された。10 μ m 粒子は貪食されず組織で分散しないが、3 μ m 粒子は分散し貪食像を認めた。炎症は 3 μ m 粒子に対して強く、in vitro の細胞実験を支持する結果が得られた。ナノレベルの CNT・二酸化チタンを皮下組織に埋入した場合もマイクロ粒子と同様に、周囲組織には血管拡張・細胞浸潤が観察され、炎症を惹起したが、3 μ m-500nm の粒子に比べ炎症の程度は低かった。CNT の一部は組織内で凝集し貪食像も認めたが、分散した CNT は組織内で確認できなかった。ナノ粒子も生体内で炎症を引き起こすことが明らかになった。

～微粒子の細胞為害作用の材質依存性とサイズ依存性～

培養液中のニッケルと鉄のイオン溶出量を ICP で計測したところ、鉄はニッケルの 4-5 倍の溶出し、どちらの粒子もサイズが小さいほど表面積が大きくなるため溶出速度が増加した。ニッケル微粒子は溶出イオンによる細胞膜障害作用が強く、細胞生存率は有意に減少した。ニッケル粒子の組織為害作用は主としてイオン溶出による化学的為害作用で微粒子の表面積の増加や物理的サイズ効果は副次的なものであった。一方、鉄微粒子のイオン溶出量はニッケルより大きいにもかかわらず、溶出が無視できるチタン粒子とほぼ同等なサイズ依存性を示した。鉄イオンは生体に対し毒性が少ないため、同じサイズの鉄とチタンの粒子に対する細胞のサイトカイン・活性酸素の放出量はほぼ同じになった。鉄微粒子の為害作用は材料非特異的な物理的サイズ効果が主であったと考えられる。

【結論】

一般に材料の組織障害作用は、細胞毒性を持つイオンの溶出による材料特異的な化学的影響が大きい。しかし、ほとんどイオン溶出しないバイオマテリアルも微粒子となると、マクロの材料とは異なり生体為害性を示す。数マイクロ以下の微粒子になると材料非特異的な物理的サイズ効果が重要になる。細胞はナノ・マイクロ微粒子を取り込んで刺激を受け活性化する。in vitro でマクロファージや好中球は 50nm までの微粒子に反応して活性酸素やサイトカインを

放出し、in vivo でもナノレベルの粒子は周囲組織に炎症を起こした。また、動物実験からはナノ・マイクロ微粒子は組織内で拡散し残留することで炎症が持続する可能性も示唆された。

本研究で明らかにされた微粒子の物理的なサイズ効果による生体為害作用は、微粒子の体内分布・動態、あるいは炎症や免疫システムへの影響といったナノトキシコロジーの最も基本的な現象であり、ナノテクノロジーが生体へ及ぼす影響を検討する上で必須の知見と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 亘 野 文 夫

副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

生体に及ぼす微粒子のナノトキシコロジー効果

(Nanotoxycological effect of particles on biocompatibility)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

審査論文は4部構成で、その概要は以下の通りである。

本研究は、微粒子において、材質や粒子サイズの違いが組織為害作用に及ぼす影響を明らかにするために、50nm～150 μ m サイズに微粒子化した材料を用いて細胞や組織に与える影響を病理組織学的ならびに生化学的に検討したものである。

試料として金属（チタン・ニッケル・鉄）、セラミックス（二酸化チタン）、カーボンナノチューブ（CNT）を用い、それぞれを 50nm から 150 μ m までの微粒子サイズに調整した。まず、in vitro で各微粒子とヒトまたはラットの生細胞（好中球・マクロファージ）を一定の比率で混和し、生存率・LDH 活性・サイトカイン産生量・活性酸素産生量を測定し、細胞の形態変化を SEM(電子顕微鏡)で観察した。次に in vivo でラット皮下埋入試験を行い、経時的な周囲組織の変化を病理組織学的に検討した。

まず、チタン・鉄・ニッケルの各微粒子のサイズを同一に調整し、材料特異的な化学的效果と材料非特異的な物理的サイズ効果とをみると、ニッケル粒子の組織為害作用は主に細胞膜障害作用の強いイオンの溶出によるもので、微粒子の表面積の増加やサイズ効果は副次的なものであった。一方、鉄微粒子のイオン溶出量はニッケルより大きいにもかかわらず、溶出が無視できるチタン粒子（チタンイオンの溶出量は測定限界以下）とほぼ同等なサイズ依存性を示し、鉄微粒子の為害作用は物理的サイズ効果が主であることが示された。

チタン微粒子に対する生体反応のサイズ依存性をみると、細胞は 3 μ m のチタン微粒子に対してはサイトカイン・活性酸素の著しい産生を示したが、10 μ m 以上の微粒子では反応は低かった。動物埋入試験でも 3 μ m 粒子の周囲組織では強い炎症性細胞

浸潤を認めたが、50 μ m 以上のチタン粒子は線維性結合組織で覆われ、サイズ依存性が確認された。なお、ニッケルとは異なり壊死組織は認めなかった。生体親和性の高いチタンも 3 μ m の粒子になると細胞に取り込まれ、炎症や活性酸素放出の原因となることが示唆された。

in vitro でナノ・マイクロ微粒子に対する細胞の反応をみると、マイクロ微粒子に対する細胞反応にはサイズ依存性がみられ、3 μ m-500nm で最大の反応を示した。生体内不活性の二酸化チタンもこの範囲ではチタン粒子と同様の傾向を示した。また、500nm 以下のナノ粒子に対しても細胞は反応し、活性酸素やサイトカイン産生量は 3 μ m 粒子と有意差がなかった。ただし、細胞生存率は高く、ナノレベルの CNT や二酸化チタン粒子は細胞刺激性を有しているものの、細胞障害性は低いことが示された。さらに、50nm の粒子も炎症の原因になりうることを示唆された。

in vivo でナノ・マイクロ微粒子に対する組織の反応をみると、ラット皮下組織への埋入実験の結果から微粒子の組織への影響にはサイズ依存性があることが示された。すなわち 10 μ m 粒子は貪食されず組織で分散しないが、3 μ m 粒子は分散し貪食像を示し、炎症性反応も強く、in vitro の細胞実験を支持する結果であった。ナノレベルの CNT・二酸化チタンを皮下組織に埋入した場合もマイクロ粒子と同様に、周囲組織には血管拡張・細胞浸潤が観察され、炎症を惹起したが、3 μ m-500nm の粒子に比べその程度は低かった。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、1) 微粒子を作用させた際の細胞の活性化とは、2) 微粒子が細胞に取り込まれたことの確認法、3) 線維芽細胞は微粒子貪食後に死滅するのか、4) 埋入実験において微粒子を貪食している細胞の種類は、5) イオン化と線維性被包、慢性炎症との関係、6) 生体内での微粒子の移動・蓄積について、7) CNT の発ガン性、8) 本実験を行う際に最も難しかったこと、9) 微粒子凝集への対処法などであった。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、チタンなどのバイオマテリアルもナノ・マイクロ微粒子となると生体為害性があること、数マイクロ以下の微粒子では材料非特異的な物理的サイズ効果が重要であること、さらに 50nm の微粒子にもマクロファージや好中球は反応し、in vivo でも周囲組織に炎症を引き起こすことを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。