

ナノ粒子の計測と生体内動態計測技術の開発

計測フロンティア研究部門 山本和弘、小野泰蔵、横山秀克、一村信吾
計測標準研究部門 榎原研正、櫻井博、高畑圭二、衣笠晋一

豊かな未来社会を担う新技術として期待されるナノテクノロジー。その産業技術としての展開に向けては、新しい技術を受け入れる社会の機運を高めるための共通認識の醸成が必要です。ナノテクノロジーが目指すのは10億分の1メートルというサイズレベルの制御であり、これまで自然界でなかなか手中にできなかったナノ粒子・構造体の活用です。このため、目的とする共通認識の醸成に際しては、さまざまな段階で社会との接点が想定されるナノ粒子・構造体の持つ特性や挙動に関する、客観的な実験結果に裏付けられた科学技術面の知見の提示が求められています。「ナノテクノロジーの社会的影響」に関する産総研TODAYのシリーズ記事(全5回)の第3回として、今回は、ナノ粒子の計測技術に焦点を絞り、ナノ粒子の生体内動態解析に向けた研究の現状と展望を紹介します。

1. どんな粒子、どんな環境が計測の対象か

2010年には20兆円を超える規模になるとも予想されているナノテク技術の製品化においては、いろいろなナノ粒子の活用が想定されています。そのサイズや形態は、対象粒子によってさまざまに変わります。例えば、産業での利用の期待が高まっているフラーレン類やカーボンナノチューブ類を代表として考えただけでも、フラーレンの直径1nmレベル、ナノチューブの直径でサブnmから数nm、長さでサブ μm からmmレベルまで多岐にわたっています。またその形態も、球状(フラーレン単体)や複雑な立体構造(フラーレン誘導体)、直線(単層、多層のナノチューブ)と多様です。さらに、ナノ粒子の凝集や反応によって、そのサイズや形態は粒子単体とはまったく異なる複雑な様相を呈することが予想されています。

このようなナノ粒子の産業応用を通じた社会との接点では、気相環境から液相環境などさまざまな存在環境を想定した上で、特に生体との相互作用に関する客観的な知見を

得ることが求められています。このような状況の中で、産総研では、次のような特徴を持つナノ粒子の計測技術を開発しています。

2. 気相中のナノ粒子のサイズを測る

気相中の浮遊粒子に対しては、粒子の粒径範囲や測定目的に応じた種々の測定技術が知られています。これらの技術は、粒子の気体中での動力学を利用するもの、光を利用するもの、およびフィルターなど固体表面での粒子捕集にもとづくものに、大きく分類できます。ナノ粒子のサイズは光の波長より小さいため、高精度の測定を光のみで実現することは容易ではなく、むしろ動力学を利用する方法が有効となります。なかでも、粒子の電気移動度に基づいて分級を行う微分型電気移動度分析器(DMA)と、粒子を凝縮核として液滴を過飽和蒸気中で成長させたあとで検出する凝縮核粒子計数器(CNC)とを組み合わせたDMA-CNC系は、粒径分布と個数濃度の測定方法として高い能力を持

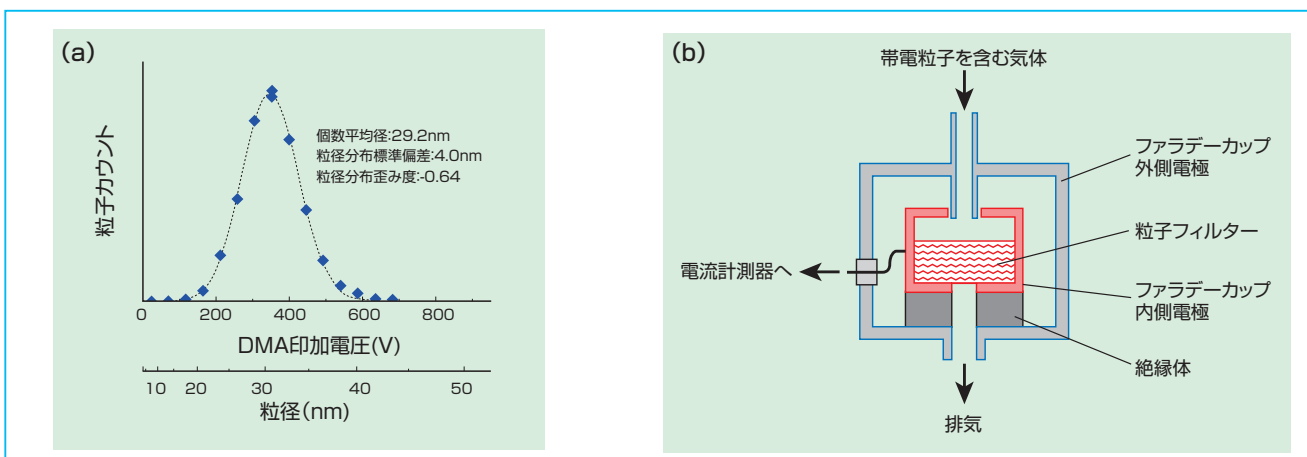


図1 約30nmのポリスチレンラテックス粒子に対するDMAスペクトルの例(図1a)と、開発中のエアロゾル電流計(図1b)。エアロゾル電流計は気体中の粒子をフィルターにより捕集し、粒子の持つ電荷を測定する装置で、全ての粒子が既知の価数に帯電している場合には、電流と気体流量から粒子数濃度を決定することができます。これをもとに凝縮核粒子計数器(CNC)の計数効率を絶対測定し、気相中のナノ粒子の精度の高い測定ニーズに応えます。

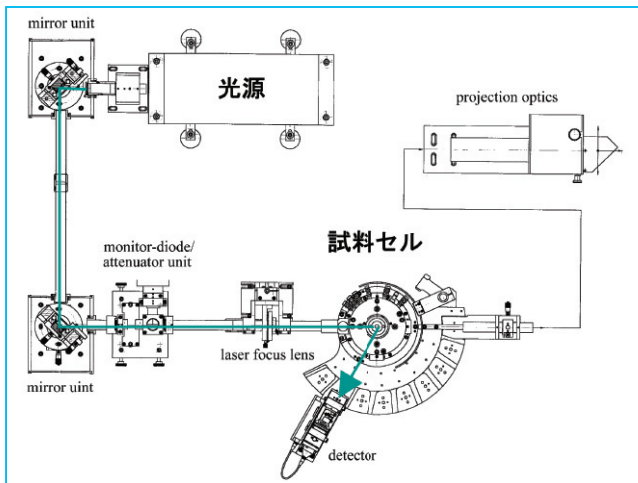


図2 測定環境の擾乱を極力抑えた高精度動的光散乱装置
この測定結果を、気相中での測定結果と比較することにより、液相中のナノ粒子計測の測定プロトコルを確立し、測定精度の向上を目指しています。

つ方法の一つということができます(図1a)。

このような測定技術の信頼性を確立するためには、粒径校正、粒径分解能評価、計数効率評価の3つの校正・評価技術が必要です。粒径校正については、産総研ではすでに100 nmから1 μ mの範囲での単分散ポリスチレンラテックス標準粒子に対して、世界屈指の精度をもつ独自の粒径絶対測定技術を確立し、標準粒子メーカー向けの依頼試験を行っています。さらに、100 nm以下30 nm程度までの粒径範囲での依頼試験の技術を、今年度中に確立する予定です。また、CNCの計数効率を評価する一次標準器としてのエアロゾル電流計(図1b)、およびDMAの粒径分解能を評価するための粒径分布幅標準試料などについても、世界に先駆けて開発を進めています。

一方、現実のナノ粒子計測に付随する課題として、カーボンナノチューブのようなきわめて異方性が高い粒子の正確な検出は可能なのか、凝集状態にある粒子に対する粒径分布からどのような情報を引き出すことができるのか、気体中にナノ粒子を安定に発生させることは可能か、などの検討も必要となります。特にDMAを用いた粒径分布測定では、粒径の関数としての帯電確率を知る必要があり、非球形粒子や凝集粒子の帯電確率についても検討する必要があります。

産総研は、DMA-CNC系による測定結果から粒径分布の任意次数のモーメントを求めるデータ解析技術、あるい

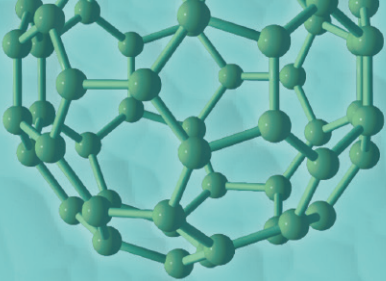
は粒子質量分布の測定技術やその応用技術など、独自の測定技術をもっており、これらを活用しながら、上に述べた課題に取り組んでいく予定です。

3. 液相中のナノ粒子のサイズを測る

液体中に分散するナノ粒子の粒径を計測する方法には、光相関法(あるいは動的光散乱法:DLS)やパルス磁場勾配核磁気共鳴(PFG-NMR)法など拡散係数から算出する方法と、静的光散乱や小角X線散乱など散乱パターンから算出する方法があります。これらの測定法は粒子計測の一般的な手法として広く利用されてきました。しかし、ナノ粒子の対象サイズが小さくなるにつれ粒径計測の高精度化の要求が高まり、トレーサビリティや測定精度などの問題が浮き彫りになってきました。さらに、粒径分布が広い場合、従来のバッチ測定では粒径分布や平均粒径値が解析ソフトやそのパラメータによって大きく変わるという、液相中の粒子計測に特有の問題も明らかになってきました。

このような問題を体系的に解決する出発点は、一度原点に立ち戻って、分布の非常に狭いナノ粒子試料に対して平均粒径を非常に精度よく決定するための技術基準(プロトコル)を作ることだと考えられます。例えば、高精度な計測装置を用いて単分散ポリスチレンラテックス(PSL)の粒径を気相中と液相中とで測定し、不確かさの範囲で両者の測定値が一致すれば信頼性の高い測定技術基準が得られます。この観点から、現在NEDOからの委託プロジェクト(ナノ計測基盤プロジェクト)に係わる研究開発の一環として、測定環境の擾乱を極力抑えたDLS装置を開発し(図2)、DMA法(気相中)との相互検証を実施しています。この装置では、50~100 nmの粒径範囲で非常によい一致が得られています。一方、1~50 nmの粒径範囲にある小さなナノ粒子に対しては、DLS法とPFG-NMR法とが有効で、DMAも含めて測定値の相互比較を行っています。

次に問題になるのが粒径分布です。既存の装置で決定される分布の信頼性はかなり低いといわれています。分布計測の信頼性を向上させるためには、粒子を分級して各分画の粒径を計測する技術が必要で、光散乱検出器を接続した流れ場分離(FFF)などが有望視されています。この測定系を一般的な分析法にしていくためには、分離性能の向上、分布精度の評価、そして技術基準の作成などの研究が必要で、上記プロジェクトの一環として取り組みを始めています。



現実の測定系はいろいろな大きさのナノ粒子複合体の分散系で、その分布状態を精確に、かつin situ計測できる技術が必要となります。このような系では、粒子以外の異物が混在している場合が多く、個々の系ごとに個別的な対応が必要となっています。今後、前処理技術も含めた技術基準を、あるまとまった個別系に対して開発していくことが必要だと考えています。

4. 生物細胞のIn vitro試験にむけたナノ粒子計測技術 電子顕微鏡を用いた計測

ナノメートルサイズの粒子を計測する方法として、電子顕微鏡（走査型電子顕微鏡：SEM、および透過型電子顕微鏡：TEM）は、ナノ粒子に適用できる高い空間分解能をもつことから、最も強力なツールとなります。特にTEMは、粒子形状に加えてその内部構造、組成や化学結合状態まで分析できるので、カーボンナノチューブ(CNT)の発見やナノテクノロジーの発展に大きく寄与したことはよく知られています。

In vitro試験に向けては、①実験前の粒子の標準的な状態を知ること、②in vitro実験培養液中の粒子の状態を知ること、③in vitro実験後の細胞試料中の粒子の状態を知ること、がTEMを用いたナノ粒子の計測課題になると考えられます(図3)。このうち課題①の、粒子単体の形状や構造、組成を知することは、現在の電子顕微鏡技術を用いれば問題

なくできます。しかし、電子顕微鏡はきわめて局所的な領域を観察するために、粒径分布などマクロな情報を調べるには他の計測方法との相補的な計測が必要で、それが今後の開発課題となります。課題②では、培養液中の粒子状態をいかにそのままの状態で電子顕微鏡の試料にするかが技術開発のポイントとなります。現在の電子顕微鏡観察技術においては、培養液そのものの観察ニーズが少ないために、ナノ粒子計測に適用できる既存技術はありません。これに向けて、超急速凍結を用いて培養液中の分散状態を保存する方法を考えています。この際、どのようにして均一な非晶質マトリックスをTEM観察に必要な薄さに形成できるかが重要です。生物系試料は軽元素で構成されているために、電子顕微鏡ではコントラストが得にくいことから、課題③は最も困難な研究課題と言えます。一般的には、生物細胞を重金属元素で染色してコントラストをつけて観察します。しかし、生物細胞の大きさはおよそ μm のオーダーで、染色された細胞試料中のnmオーダーの微粒子（特に、フラーレンやナノチューブなどの軽元素物質）を観察するのは非常に困難になるものと予想されます。そこで細胞試料を無染色で観察する技術として、透過電子線のうち非弾性散乱電子をエネルギー選別で除去することにより、コントラストのついた画像を得る方法の採用を考えています。また、生物細胞は水分を含むため電子顕微鏡での観察には細胞の形態を壊すことなく脱水処理をすることも必要になるので、試料の調製技術も開発対象にしています。同時に上記①～③の課題を遂行する上で有力なツールとなる、観察データからナノ粒子の分散状態を評価できる画像処理技術も開発する予定です。

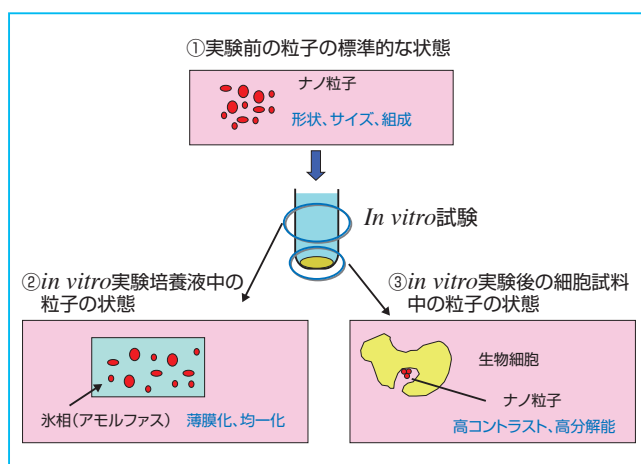


図3 In vitro試験にむけたTEMを用いたナノ粒子計測技術の課題
①実験前の粒子の標準的な状態、②in vitro実験培養液中の粒子の状態、
③in vitro実験後の細胞試料中の粒子の状態。これらを計測することにより、
生体との相互作用の解明に役立てることができます。

5. In vivo試験に向けたナノ粒子計測技術 ナノ粒子の標識技術とESRを用いたイメージング

ナノ粒子のように新しい物質の安全性が問われる時、新規物質の生体内での動態は毒性学的な基礎データとして必須です。各組織の所見や毒性発現に一つの根拠を与えるものでもあります。しかし、フラーレン類やCNT類は、均質な物質の集合ではなく構造も大きさも凝集状態も異なる不均質な物質の集合体ですから、一定の構造を持った均質な医薬品の体内での動態を調べるような訳にはいきません。したがって、フラーレン類やCNT類の生体内での動態研究

は科学の研究対象としてはきわめて興味深いものとなります。

*In vitro*計測手法としては、フラーレン類、CNT類を暴露試験または直接投与した動物を解剖して、各組織について電子顕微鏡で観察するという方法が考えられます。しかし、前項でも紹介したように、解決しなければならない問題があります。微視的な領域を調べる方法としては電子顕微鏡に勝る方法はありませんが、全体を捉える相補的な他の測定手法と組み合わせられるべきものです。

フラーレン類やCNT類の体内での動態を*in vivo*で、しかもリアルタイムに非侵襲で全体像として捉える方法があれば、リスク評価方法としてきわめて優れているといえます。*In vivo*の非侵襲技術としては、陽電子放射断層撮影法（PET：Positron Emission Tomography）や磁気共鳴法が想定されます。しかし、フラーレン類やCNT類はPET測定に必要な陽電子の放出をしませんし、そのような修飾による誘導体化は困難です。磁気共鳴法には、核磁気共鳴（NMR：Nuclear Magnetic Resonance）と電子スピン共鳴（ESR：Electron Spin Resonance）が考えられます。医療現場で用いられている画像診断のMRI（Magnetic Resonance Imaging）は、生体内の水に含まれる水素核スピンの基づくイメージングですから、炭素だけからなるフラーレン類やCNT類は測定の対象にはなりません。唯一可能性として残る炭素原子の核磁気共鳴は、核スピンのない ^{12}C に比べて核スピンを持つ ^{13}C の天然同位体の存在比がきわめて低い（およそ1%）ことが問題となります。このため、産総研では既存の二つの要素技術を融合したESRによる測定技術の可能性を検討しています。

その二つの要素技術とは、一つは、極安定パーフルオロアルキルラジカルと呼ばれる室温空气中で安定であるだけでなく無希釈のフッ素ガスとさえ反応せず、蒸留やガスクロマトグラフィーでも分析が可能といった極限の安定性を有するラジカルを合成する技術。もう一つは、ラジカルの電子スピンを選択的に直接検出できる唯一の測定法である電子スピン共鳴法を利用したESR画像法という最先端技術です。

これら二つの技術を融合してCNTの生体内での動態を調べるには、上述の極安定ラジカルでCNTを標識する技術と、標識したCNTの生体内での動きをリアルタイムで見る

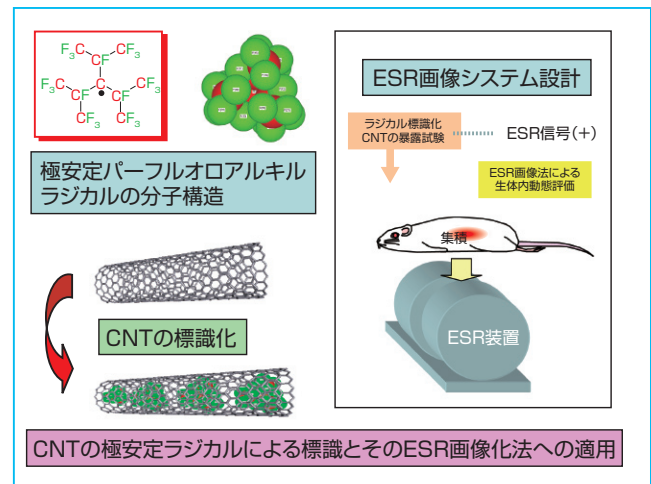


図4 ナノ粒子の標識とESRを用いたイメージングの模式図
カーボンナノチューブ（CNT）の内部に極安定パーフルオロアルキルラジカルと呼ばれる標識ラジカルを導入し、これを実験動物に対する暴露試験により吸入させ、標識CNTの集積部位をESR画像システムで非侵襲的に調べます。こうした手順でCNTの生体内動態を*in vivo*でリアルタイムに観察する手法を開発し、CNTのリスク評価の基礎データを得ることを目指しています。

ためのESR画像法を開拓する必要があります。標識方法は、CNTの物性変化を最小限に抑える目的で図4に示したようなCNT内部への導入を予定しています。現在、高純度の極安定ラジカルを高い収率で合成する方法論、ならびにこのラジカルに適したESR画像装置の開発を進めています。ゴールは、10分程度の時間分解能と数mm程度の空間分解能、そしてラジカル濃度としてmmolからサブmmol濃度程度（CNT濃度としておよそ μmol 濃度程度）の検出限界の実現です。このナノ粒子の標識技術とESRイメージング技術が融合したナノ粒子計測技術が完成すると、CNTの構造と生体内での動態との関係についても調べることが可能となり、CNTのリスク評価の基礎が固まります。

6. 計測技術開発のこれから

上に示した計測法は、国際的な認知が得られれば、計測法、計測技術としてその有用性が高まります。そのため、上記の研究開発の推進に際しては、今年度新たに発足したISO TC229（ナノテクノロジー）などを提案の場とする国際標準化の活動も並行して進めていく計画です。