

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進事業

ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の
組織反応性とバイオ応用

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成 15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用 …… 1
亘理 文夫

(研究協力者報告)

- a. X線を用いたナノ領域分析手法開発に関する研究 …… 25
朝倉 清高
- b. カーボンナノチューブ類の化学処理・サイジングと遺伝子導入への試み …… 30
進藤 正信、古月 文志、野田坂 佳伸、柴 肇一
- c. カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用 …… 35
赤坂 司、宇尾 基弘
- d. カーボンナノロッドは Toll-like receptor2 を介してマクロファージを活性化する … 47
柴田健一郎、安田 元昭、古月 文志
- e. 水懸濁分散化カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブの …… 55
骨芽細胞培養系における作用
田村 正人
- f. CNT を支持体とした DNA の高分解能電顕観察 …… 59
矢田慶治、高橋 元

II. 分担研究報告

1. バイオ応用を目指したカーボンナノチューブの合成、高純度精製、 …… 61
サイズ制御、及び水溶化フラーレンに関する研究
田路 和幸
2. ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性と …… 76
バイオ応用に関する研究
戸塚 靖則
3. カーボンナノチューブの固化とその表面修飾に関する研究 …… 91
大森 守
4. カーボンナノチューブ (CNT) 固化体の特性評価ならびに …… 105
CNT と Ti の HAp コーティングに関する研究
橋田 俊之
5. ナノチューブ、ナノ微粒子の単体および集塊の組織反応に関する研究 …… 111
川崎 貴生

6. ナノ磁性微粒子の生成とナノ化に伴う特異磁性についての コンピュータシミュレーション 羽田 紘一	131
7. 医療用カテーテル利用を目的とした高分子ゲルの耐久性と発生力の向上 野方 文雄	141
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	165
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	169

厚生労働科学研究費補助金
(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

総括研究報告書

ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の
組織反応性とバイオ応用

主任研究者 亘理 文夫 北海道大学大学院歯学研究科 教授

研究要旨

チタンは金属中、最も生体親和性に富むとされ、インプラントにはよく使用されている。しかしマクロサイズで生体親和性を示すが、ミクロな微粒子になると為害性を惹起し、その程度はサイズに依存する。細胞生存率、LDH、活性酸素、サイトカイン放出量、細胞の形態変化等の細胞機能性試験では100 μm 以下になるとサイズ依存性が顕現化し、特に細胞よりも小さな10 μm 以下では貪食を誘発し、顕著な細胞毒性を発現する。ICP元素分析ではイオン溶出は認められず、溶解イオンによる化学的効果とは異なる、物理的サイズに由来する細胞毒性効果である。炎症性サイトカインIL-1 β は典型的な単調増加依存性を示すのに対し、TNF- α は3 μm 以下で急激な増加を示し、顕微鏡で同時に観察される貪食作用に伴い特異的に放出されると考えられる。動物埋入試験では150 μm 粒子の場合、各粒子ごとに線維性結合組織で被包化され、巨視的サイズの棒状チタンと同様な親和性を示したが、粒径が小さくなるにつれ炎症性細胞浸潤が亢進し、3 μm 粒子では巨食細胞によって貪食され、長期間炎症性反応が継続した。こうした物理的サイズ効果は臨界粒径およそ100 μm を境としてそれ以上では生体親和性を示し、それ以下ではサイズの縮小とともに細胞刺激性が亢進し、10 μm 以下で顕著な為害性を引き起こす点で、*in vitro*と*in vivo*の結果は定量的にもよく一致した。

摩耗粉が為害性を惹起するチタンの欠点の対策として、表面を窒化することにより、硬さ、引っかき硬さ、耐摩耗性ともチタンの約10倍増になり、耐摩耗性を著しく改善できた。動物実験ではインプラントの生体親和性、微粒子の為害性ともチタンとほぼ同等で、生体親和性を十分有し摩耗粉発生を抑制できる耐摩耗性インプラントとして期待される。

従来、紫外線照射が必須で生体応用が困難だった光触媒二酸化チタンを金属イオン修飾することにより、可視光応答性を付与し、歯科治療用光重合照射器で齶蝕原生菌 *streptococcus mutans* に対し、85%以上の抗菌効果を示し、またヒト天然歯に対しても20分の照射で十分な漂白効果が得られた。

バイオ用カーボンナノチューブの開発のため、アーク放電による大量合成、加熱焼却・酸処理溶解による精製高純度化、イオン基付加による可溶・単離・分散化、剪断加工・強酸処理による切断・サイズ制御を行った。また遺伝子、蛋白質、糖鎖チップ等の結合、付加のためにビオチン化、ポリスチレンスルホン酸、インターカレーター等による表面修飾を行った。高分解能透過型電顕を用い合成、単離、形状の確認を行うとともに、EXAFSにより触媒金属原子周囲の構造情報を解析した。

過塩素酸水溶液により精製し、両性イオンミセルにより可溶化後、インターカレーター付加により、プラスミドを結合したナノロッドを媒体として、リン酸カルシウム法により遺伝子導入を試みた。またナノロッド添加に対し、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞とヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 MG-63 細胞の培養後の生細胞数は増殖促進、抑制と相異なる傾向を示した。さらにヒトマクロファージ系細胞株 THP-1 細胞は Toll-like receptor 2 を介してナノロッドを認識し、転写因子 NF- κ B が活性化することにより、TNF- α 産生が誘導される細胞認識・サイトカイン放出機序を明らかにした。

放電プラズマ法で作製したナノチューブバルク焼結体は最大荷重示現後、破断までの変位が大きな準脆性的な挙動を示し、セラミックスとしては特異的な高破壊靱性を示した。ラット腹部皮下埋入試験では線維性結合組織に被包化され、集塊内粒子間にもコラーゲン線維の産生が多数認められた。

DNA 繊維の高分解能電顕観察のためにグリッド孔が $0.1 \mu\text{m}$ 程度の観察用支持体としてナノチューブを応用した。

液相反応法により作製した Fe_3O_4 ナノ微粒子の磁気特性は粒径に依存して変化し、その特異磁性は表面磁気異方性の影響を受けていることがシミュレーション計算から示唆された。

人工筋肉(アクチュエータ)用ナノ分子構造制御高分子ゲルとして、積層構造化により電界下における Nafion の発生力を通常の3倍まで増大させ、高温加熱処理により塩基性環境下で分解しやすいポリアクリロニトリルゲルの耐久性を著しく向上できた。

分担研究者

大森 守

東北大学金属材料研究所 助手
附属新素材設計開発施設

田路 和幸

東北大学大学院工学研究科 教授

橋田 俊之

東北大学大学院工学研究科 教授
附属破壊制御システム研究施設

戸塚 靖則

北海道大学大学院歯学研究科 教授

川崎 貴生

北海道大学大学院歯学研究科 教授

野方 文雄

岐阜大学工学部 教授

羽田 紘一

石巻専修大学理工学部 教授

A. 研究目的

I. ナノ/マイクロ微粒子と生体適合性

A 1. 生体適合性の微粒子サイズ依存性

(1) バイオマテリアルとしてのチタンの問題点

チタンは金属中、最も生体親和性に富むとされ、ニッケル等に起因する金属アレルギーの患者にはチタンによる代替が有効であり、またインプラントには最もよく使用されている。しかし用途によっては必ずしもすぐれた臨床報告ばかりではない。義歯床用金属としては従来のコバルトクロム合金 (Co-Cr) に比べ、ヤング率が約 $\frac{1}{2}$ で撓みやすく人工歯等の構造体を搭載するにはやや不安があるのが欠点として挙げられ、逆にインプラントとしては骨に比べヤング率がなお高すぎ、周囲骨への重力負荷刺激を低減するために骨が菲薄化する原因ともなる。またさらに重大な問題点として耐摩耗性に劣る点があり、大腿骨人工関節等のインプラントでは骨頭

摺動部で発生した微細な摩耗粉が為害性を惹起する。臨床外科医から本当にチタンは良いのかという声が聞かれるのは主としてこのやや低い耐摩耗性に起因する摩耗粉のためと考えられる。

(2) バルク体と微粒子の生体適合性

マクロサイズでの生体親和性に対し、ミクロな微粒子が為害性を示すことは生体に対する作用機序が一樣ではないことを示唆する。マクロとミクロの境界となる臨界寸法はどれだけか、生体適合性のサイズ依存性の原因はなにか、そのメカニズムを解明することが必要である。

(3) 材料の生体適合性に対する生化学的評価方法の導入

従来、生体材料の評価には細胞の生死、形態変化、溶血性を指標とする細胞毒性試験や炎症反応の有無、被包化、骨形成を観察する動物試験が行われてきたが、いずれもマクロな生体反応現象の観察から判定するものであった。本研究ではこうした微粒子の生体親和性に及ぼすサイズ依存性を解明するために、サイトカイン検出など各種細胞機能性試験の生化学的手法に基づく材料の評価法を導入し、為害性発現のプロセスを解析し、同時に動物埋入実験に基づく組織反応の病理学的観察を行い、巨視的寸法のインプラントとは異なる、微細な粒子状態が生体適合性に及ぼす影響について細胞機能性試験 (in vitro) および動物埋入試験 (in vivo) で調べることを第1の目的とした。

A 2. 耐摩耗性窒化チタンインプラントの開発

次に摩耗粉に対する生体反応、作用機序の解明、その対策は、高齢社会のニーズから是非答えなければならない課題である。

摩耗粉に対する対策として高硬度の窒化チタン (TiN) に注目し、表面窒化チタン (Ti(N)) に対して引っかかり硬さ、摩耗試験を含む種々の機械的特性試験とバルクインプラント体と微粒子の動物埋入実験による生体適合性の評価を行い、耐摩耗性窒化チタンインプラントの開発基礎研究を行った。

II. 微粒子のバイオ応用

細胞、タンパク質、DNA サイズにおける生体との相互作用に注目し、その作用機序を把握した後はナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子を逆に生体に導入し、バイオ応用展開を図ることを本研究事業のもう一つの大きな目的とした。

A 3. 可視光応答型光触媒二酸化チタンの開発とその応用

その一つとして光触媒の生体応用を検討した。従来使用されてきた光触媒二酸化チタンでは、光触媒効果を発現させるには紫外線照射が必要で生体へ応用するには障害があった。人体への応用を可能にするためには可視光応答性を付与することが必要である。本研究では光触媒二酸化チタンを金属イオンで修飾して可視光応答性を付与することを試み、さらにこれを利用した抗菌性効果と歯牙漂白への応用研究を行った。

A 4. カーボンナノチューブ単体のバイオ応用

また最も代表的なナノ微粒子であるカーボンナノチューブに注目し、そのバイオ応用の可能性を検討した。カーボンナノチューブの応用は大きく二つに分けて考えることができる。

ひとつは微粒子のマイクロ単体の利用であり、nm サイズを利用するいわゆるバイオとしての応用である。遺伝子、蛋白質、糖鎖、細胞チップの微粒子への吸着、結合、修飾、付加等により、例えば抗癌剤が健常組織に吸収され重大な副作用を起すのを避け、癌疾患部にのみ薬剤を運搬する DDS(ドラッグデリバリーシステム)や細胞への遺伝子導入のキャリアー材料、組織再生時のスカフォールド(担体)等への応用が考えられる。

A 5. バイオ用カーボンナノチューブの開発

(1) バイオ用試料調整の課題

以上の実現のためにはまずバイオ用カーボン

ナノチューブの開発が必要である。現状のカーボンナノチューブにはアモルファスカーボン、金属触媒が混在し、粒子どうしが凝集しているため、そのままではバイオ応用には使用できない。バイオ応用の目的のために、大量合成、高純度化、サイズ分布の均一化、微粒子同士の凝集を防ぎ、可溶・単離・分散化を図る必要がある。またデリバリーシステム、スカフォールド、金属・蛍光ラベリングのためには遺伝子、蛋白質、糖鎖チップ等を微粒子上に吸着、結合、修飾、付加する技術が必要である。これらバイオ用カーボンナノチューブ作製・表面改質に必要な方法を確立することをめざした。

(2) 細胞内単体の観察・評価

これらの試料の合成、形状、分散、単離の確認に高分解能電子顕微鏡観察を行うとともに、放射光を利用し特定元素周囲の原子間距離や配位数などの構造情報を得ることのできる EXAFS 解析、高エネルギー分解能の元素マッピングを行うことのできる EXPEEM 開発も行った。

細胞内導入あるいは貪食作用により取り込まれた細胞内部のナノチューブ・微粒子の確認、評価には、単に微粒子を単独に観察するのとは違った高度な顕微鏡観察技術が必要である。導入の有無の確認、効果の定量的評価のために表面修飾による蛍光ラベリングを利用した光学的測定法を開発することもめざした。

A 6. バイオマテリアル(バルク体)としてのカーボンナノチューブの応用

カーボンナノチューブのふたつめの応用は微粒子の大量合成によるバルク集合体、焼結体の利用である。これはインプラント、人工臓器・組織代替用材料あるいは薬剤を体内で長期放出する徐放性インプラント等、マクロサイズのバイオマテリアルとしての応用である。

通常、カーボンナノチューブは物理学的見地から単体としての性質が注目されることが多く、バルク体として生体応用の可能性を検討したも

のはほとんど見当たらない。生体材料(マテリアル)としての使用には被覆膜やバルク固体である必要がある。単体は原子数個大の中空状であるから、これを固めることができればきわめて軽量で強度の大きな材料になる可能性がある。しかし一般にカーボン材料は難焼結性であり、被覆膜やバルク固体を実現するために、大量合成法としてアーク放電を、焼結固化法として放電プラズマ焼結法を採用した。得られたカーボンナノチューブ固化体についてその機械的特性と生体適合性を調べた。

カーボンナノチューブの生体適合性は材質的にはC(炭素)であるから、ハイドロキシアパタイトのような bioactive(生体活性)ではなく、アルミナ、ジルコニア等のような bioinert(生体不活性)と予想される。生体親和性を向上させるための表面処理としてチタンやアパタイトを被覆することも行った。

A 7. カーボンナノチューブの DNA 高分解能電顕観察用支持体への応用

DNA 繊維の高分解能電子顕微鏡観察には電子ビームに耐え安定に保持できる、グリッド孔が $0.1 \mu\text{m}$ 程度のマイクログリッドが必要である。直径が数 nm と小さく長さが数 μm あるカーボンナノチューブはこの目的に相当と思われる、網目状にした DNA 観察用支持体を作製することを試みた。

A 8. ナノ磁性微粒子の生成と特性

磁性粒子のナノ化に伴い特異な磁性が顕現することを指摘してきたが、この観点から、ある種の生物の体内組織での合成が確認されているマグネタイト Fe_3O_4 や光触媒材料の二酸化チタン TiO_2 について、単離・分散した微粒子を直接得ることのできる液相反応法を用い合成を行った。金属微粒子については真空蒸着装置を改良し作製を試みた。

A 9. ナノ分子構造制御高分子ゲル

心臓や四肢の柔軟な動きを模倣するポンプや人工筋肉(アクチュエータ)、特に医療用カテーテルへの応用を目的として、Nafion とポリアクリロニトリル(PAN)ゲルの高分子ゲルに着目し、その改良強化を図った。

B. 研究方法

B 1. 微粒子の生体適合性試験

(1) 試料

微粒子粉末として以下を取り上げた。

金属: Ti, 表面窒化チタン(Ti(N)), Fe, Ni

セラミックス: TiN , TiO_2 , 可視光応答型光触媒二酸化チタン($\text{TiO}_2/\text{Ag, Cu}$ ほか), カーボンナノチューブ(カーボンナノロッド(CNR)、単層カーボンナノチューブ(SWCNT)、多層カーボンナノチューブ(MWCNT))

チタンではマクロ大($1 \phi \times 5\text{mm}$)の 99.9%Ti 棒(ニラコ)および $3 \mu\text{m}$ (添川理化工業)、 $10 \mu\text{m}$ (高純度化学研究所)、 $40 \mu\text{m}$, $150 \mu\text{m}$ (住友シックス) 大の Ti 微粒子をエチルアルコールで洗浄後、オートクレーブで 121°C , 2atm , 20min 滅菌して用いた。他の微粒子についても同様な前処理を行って使用した。

(2) 粒度の調整

また粒子サイズを一定に揃え、材料(Ti, Fe, Ni, TiO_2)間の厳密な比較を可能にするために、粒度分布測定装置でモニターしながら、粒度分布の異なる粒子群に沈降法を適用して $0.5, 3, 10 \mu\text{m}$ 粒子を、また限外濾過法を適用して 300nm 以下の粒子をそれぞれ抽出した。

(3) 形状依存性

形状依存性を調べるために、形状異方性の小さい不定形(以下、塊状と記述)およびアスペクト比の大きい針状の、それぞれ平均径、長径が $0.5, 3, 10 \mu\text{m}$ でほぼ同等な TiO_2 微粒子を抽出し、細胞機能性に及ぼす形状効果を比較した。

(4) 溶出試験

チタン微粒子を pH7.4 に調整した

HBSS(Hank's Balanced Salt Solution) 溶液に 37°C、1ヶ月浸漬後、ICP(日立 P-4010) 元素分析を行なった。検出された Ti が溶出イオンかチタン微粒子自体なのかを区別するために、混和液を遠心分離後、上澄み液(濾過前)と、さらに 0.45 μ m のメンブレンフィルター濾過後とを分析し比較した。

(5) 細胞機能性試験

健康者から採取したヒト好中球を使用し、細胞生存率、LDH(Lactate Dehydrogenase) 産生量、チトクローム C 還元法による活性酸素産生能、および ELISA kit(Endogen) を用いたサイトカイン IL-1 β , TNF- α 放出量の測定を行った。また好中球をチタン微粒子混和液に添加、37°C、1hr 保持した後、固定、脱水、臨界点乾燥、蒸着し、好中球の形態変化を SEM(日立 S-4300) による観察およびエネルギー分散型 X 線元素分析 (EDS) による元素分析を行った。細胞としてはほかにラットマクロファージ、ヒト歯肉線維芽細胞も用いた。

(6) 動物埋入試験

ウィスター系雄性ラット腹部皮下にチタン棒、微粒子を埋入し、1-30 週後に周辺組織を摘出し、通法によりパラフィン包埋後、薄膜切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡により組織観察を行った。

B 2. 耐摩耗性窒化チタンインプラントの開発

JIS 1 種純チタンを 1 気圧窒素雰囲気下、850°C、7 時間の条件で処理し、表面窒化チタンを作製した。ビッカース硬さ、マルテンス引っかけ硬さ、超音波スクレーパー摩耗試験を行い、圧痕、摩耗痕の断面プロファイルを表面粗さ測定器で測定した。棒状インプラント、粒径 1 μ m の微粒子の動物埋入試験を行い、生体適合性を評価した。以上のすべての試験を純チタンについても行い比較した。

B 3. 可視光応答型光触媒二酸化チタンの開発と応用

粒径 300nm および 6nm のアナターゼ型二酸化チタン微粒子に原子吸光用標準液を適宜希釈し、365nm の紫外光照射し各種金属イオンを光析出させた。

光触媒能は歯科用光重合照射器を使用し、470nm をピークとする可視光照射によるメチレンブルー溶液の色素分解能から評価した。

抗菌性試験はゾルーゲル法でガラス板にコーティングした二酸化チタン皮膜を同様に金属イオンで修飾し、齶蝕原生菌 *streptococcus mutans* を滴下、光照射後、寒天培地で培養し、コロニー数を計測し評価した。

歯牙漂白はヒト抜去歯牙表面に蒸留水で湿潤させたイオン修飾二酸化チタンを塗布し、5 分ごとに計 20 分光照射し行った。

B 4. バイオ用カーボンナノチューブの開発

(1) 合成

アーク放電法により、Fe/Ni、Ce 等種々の触媒金属を用いて単層/多層カーボンナノチューブの大量合成を行った。また市販のナノロッド(島津製作所)、多層ナノチューブ(NanoLab) も購入し、原素材とした。

(2) 精製高純度化

得られた合成物にはアモルファスカーボン、金属触媒が混在し、純度、カーボンナノチューブの含有率は高くない。加熱焼却によりアモルファスカーボンを除去し、酸処理溶解によりナノロッド(島津製作所)については触媒の Ni を、多層ナノチューブ(NanoLab) については触媒の Fe を除去し、精製高純度化を図った。

(3) 表面修飾-可溶分散化・単離、切断

疎水性で凝集しやすいナノチューブのイオン基付加による可溶・単離・分散化を行った。またバイオ応用には長径が大きすぎるので、剪断加工・強酸化学処理による切断・サイズ制御を試みた。

また遺伝子、蛋白質、糖鎖チップの微粒子への吸着、結合、付加等を実現するために、分子結合を可能とする表面修飾を行った。

B 5. カーボンナノチューブ単体の特性と応用
試料の合成、形状、単離の確認に高分解能電子顕微鏡観察を行った。また高エネルギー物理学研究機構放射光実験施設 BL9A を用い、EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) および EXPEEM(energy filtered X-ray photoemission electron microscopy) の実験を行った。

生体反応性については種々の細胞機能性試験、細胞認識・サイトカイン放出機序の解析、骨芽細胞培養に及ぼす影響解析、細胞への遺伝子導入および単体/集塊のラット皮下への動物埋入試験を行い、光学顕微鏡、SEM 観察を行った。

B 6. カーボンナノチューブ焼結バルク体の作製とその特性

(1) 作製

精製した多層ナノチューブおよびナノロッドを放電プラズマシステム (SPS) により焼結しバルク体を作製した。

また材質的には C(炭素)であり、生体適合性は bioinert(生体不活性)と予想されるカーボンナノチューブに bioactive(生体活性)な特性を付与するために、固化カーボンナノチューブ表面に電子ビーム蒸着法によりチタン金属を被覆し、その上にさらにハイドロキシアパタイトの被覆を試みた。

(2) 特性解析

カーボンナノチューブ焼結固化体の力学的特性評価のために、小型円盤状試験片(10φ x1mm)を用いたスモールパンチ(SP)試験を行い、荷重-変位曲線から破壊強度、破壊エネルギーを評価した。また同時にアコースティックエミッションも測定し、試料内部での破壊機構の解析を行った。

(3) 生体適合性試験

単体/集塊のラット皮下への動物埋入試験を行い、光学顕微鏡による病理学的検索、

SEM 観察を行った。

(倫理面への配慮)

in vitro 試験用の細胞は代表的なものについて市販のものを購入、ヒト好中球を用いた研究は北海道大学大学院歯学研究科・歯学部倫理委員会の承認を得て行った。動物実験は北海道大学歯学部動物実験に関する指針に基づき行った。

C. 研究結果

C 1. 微粒子と生体適合性

(1) 溶出試験

チタン微粒子を混和した HBSS 溶液を遠心分離後、上澄み液を ICP 元素分析しチタンを検出した(0.12ppm)。検出された Ti が溶出イオンかチタン微粒子自体に由来するのかを区別するために、0.45 μ m のミリポアフィルター濾過前後を比較した。フィルター濾過後は検出限界値以下であった。Ti の検出に寄与したものは 0.45 μ m 以上の微粒子であり、チタン微粒子からのイオン溶出は無視できるレベルであることを確認した。

(2) 細胞機能性試験：サイズ依存性

マクロサイズのインプラントとして生体親和性を示すチタンは微粒子としてサイズが小さくなると細胞生存率が低下し、LDH、活性酸素、サイトカインの放出量が増加した。図 1 にヒト好中球の細胞生存率、IL-1 β 放出のチタン微粒子サイズ依存性を示した。微粒子サイズが 150 μ m から 50,10,3,0.5 μ m と小さくなるにつれ、細胞生存率は低下し、炎症性サイトカイン IL-1 β 放出は増加した。

図 2 に Ti, Fe, Ni に対するヒト好中球からの IL-1 β 放出の微粒子サイズ依存性を示した。いずれの金属でも絶対値は異なるものの、100 μ m 以下で微粒子サイズが小さくなるにつれ、放出量が増加し典型的なサイズ依存性を示した。イオン溶出が無視できる Ti と溶出する Fe はともに非常に類似したサイズ依存性を

示し、一方Niでは相対的により低い値を示した。

図3はヒト好中球からのTNF- α 放出のTi, Fe, Ni微粒子サイズ依存性を示したものである。いずれの金属でも10 μ m以上では放出がきわめて低レベルであるのに対し、3 μ m以下になると急激な増大を示した。このとき図1のSEM観察像のようにHBSS溶液中のヒト好中球はコントロール(a)および10 μ m大以上のTi微粒子混在時(b)に対し、3 μ mTi微粒子混和液では(c)のように貪食像が観察され、EDS元素分析から好中球に内在する粒子はTiであることが確認された。

(3) 細胞機能性試験：形状依存性

形状が比較的等方的な塊状および異方性の針状の、それぞれ平均径、長径が同じ0.5, 3, 10 μ mのTiO₂粒子に対して、細胞機能性試験を行った。ともにサイズ依存性を示すが、比較すると細胞生存率、LDH、活性酸素、IL-1 β は針状のほうが高い刺激性を示した。TNF- α については細胞と同等サイズの3, 10 μ mでは針状のほうが刺激性に富み、細胞よりはるかに小さな0.5 μ mになると塊状と針状微粒子間の放出量の差は小さくなり、貪食能への形状の影響は小さくなった。

(4) 細胞機能性試験：材料依存性

ともに生体親和性で、ICP元素分析でイオン溶出が無視できることを確認したTiと溶出しやすいFeはよく似たサイズ依存性を示した(図2, 3)。Niは細胞生存率が低く、LDH放出量は高かったが、活性酸素、サイトカイン放出量は低下し(図2, 3)、顕微鏡では細胞の破壊が観察された。

(5) 細胞機能性試験：細胞依存性

ヒト好中球、ラットマクロファージに比べ、ヒト歯根膜細胞もサイズ依存性を示したが、その反応の程度は相対的に低かった。

(6) 動物埋入試験

ラット軟組織埋入試験では150 μ mチタン粒子の場合、各粒子が個別に線維性結合組織で

周囲を覆われ、炎症性細胞はほとんど認められず、巨視的サイズの棒状チタンと同様な生体適合性を示した。40 μ m粒子では各粒子が結合組織で周囲を覆われるが炎症性細胞も現れ、10 μ m粒子では粒子群内部に結合組織と炎症性細胞浸潤が形成され、3 μ m粒子では粒子間には結合組織は形成されず、粒子が巨食細胞によって貪食され、長期間炎症性反応が継続した。3 μ m粒子は当初、組織中に広く分散していたが、埋入期間とともに次第に凝集し、やがて粒子群全体をおおうように線維性結合組織が形成され、大部分の粒子は高密度に局在化したまま長期間炎症性反応が継続した。

C2. 耐摩耗性窒化チタンインプラントの開発

(1) 機械的性質

図4はチタン表面に形成された窒化チタン層の断面SEM像である。約2 μ mの窒化層が表面に形成されている。薄膜X線回折から窒化膜はTiNとTi₂Nからなることが同定された。この表面窒化チタン(Ti(N))のビッカース硬さはチタンの146に対し1308と約10倍に増加した。

図5はマルテンス引っかかり硬さ試験の様子を示したものであり、図6は引っかかり硬さ試験後の断面プロファイルで、チタンと表面窒化チタンを比較したものである。マルテンス引っかかり硬さ試験においても引っかかり痕が形成される耐荷重が10gから100gへと約10倍に増加している。

図7は荷重と回転速度の条件を調節しながら、摩耗量を測定できるように設定した歯科用超音波スケーラー摩耗試験の様子を示したものである。図8は超音波スケーラーをフリーハンドで操作した後の表面(a:チタン、b:表面窒化チタン)である。窒化チタンでは全く研磨傷が認められない。

図9は超音波スケーラー摩耗試験後の断面プロファイルである。ステンレス製チップを用いた超音波スケーラーに対してもチタンと表面窒

化チタンを比較すると、チタンでは 50g で既に摩耗痕が認められるのに対し、窒化チタンでは 500g でも摩耗痕は形成されず、耐摩耗性がきわめてすぐれていることがわかる。

(2) 生体適合性

一方、棒状表面窒化チタンインプラント体の動物埋入試験後、新生骨形成の組織計量検索を行うと、骨形成量およびインプラント表面への骨の直接接触率はチタンと有意差はなく、インプラント体の組織反応性はチタンとほぼ同等の生体親和性を示した。

図 10 は窒化チタン微粒子 (b,d,f) を埋入したときのラット軟組織の反応をチタン (a,c,e) の場合と比較したものである。上段 (a,b) は埋入 1 週後、中段 (a,b) は 4 週後、下段 (a,b) は 8 週後である。4 週頃まで炎症性細胞浸潤、マクロファージによる貪食が顕著である。8 週にかけて粒子は次第に凝集してきている。ともに炎症反応を呈しているが、TiN の微粒子埋入試験においても為害性発現はチタンとほぼ同等であった。

C 3. 可視光応答型光触媒二酸化チタンの開発と応用

現在、齲蝕治療ほかの歯科治療に用いるコンポジットレジンの光重合硬化には 470nm をピークとする可視光を発生する光重合照射器が使われている。図 11 はこれを用いて可視光を照射した際の Cu イオン修飾二酸化チタンの光触媒作用を示したものである。粒径 300nm の二酸化チタン微粒子では色素分解能がほとんど得られないのに対し、金属イオン (Cu) で修飾することにより、色素分解作用が発現し可視光応答性が得られることが見いだされた。また粒径 6nm の超微細粒子では金属イオン修飾なしでも可視光応答性を示した。

図 12 は可視光応答型光触媒能の修飾金属イオン種依存性を示したものである。Cu, Pd, Au, Ag についてそれぞれ最もすぐれた光触媒能を示した条件での結果どうしを比較し

ている。これらの金属種の中では Ag が最もよい成績を示した。

図 13 は最も代表的な齲蝕原生菌である *streptococcus mutans* に対する二酸化チタンの抗菌効果を示したものである。Ag 修飾により可視光照射下で 85% 以上の菌の死滅が認められ、十分な抗菌効果が認められた。

図 14 は Ag イオン修飾二酸化チタン光触媒を用いたヒト天然菌に対する歯牙漂白効果である。左は漂白前、右は漂白後である。漂白前後で L* a* b* 表色系で色差値 16.3 が得られ、一般に色差値 6.0 以上で明らかな色調変化があるとされるから、十分な漂白効果があることがわかる。

C 4. バイオ用カーボンナノチューブの開発

(1) 合成

カーボンナノチューブの作製方法として従来のレーザー加熱法、化学気相堆積法に比べ、大量合成可能なアーク放電法を採用した。触媒金属として Fe/Ni、Ce を用いることにより、それぞれ高速道路型、ウニ型の単層ナノチューブを、触媒なしでは多層ナノチューブを作製することができた。

(2) 精製高純度化

湿式粉碎、湿式酸化、水熱処理、遠心分離、燃焼酸化などの処理を組み合わせることにより、アモルファスカーボン、グラファイトカプセル、グラファイト、触媒金属を除去し精製高純度化することが可能となった。またナノチューブの切断には高回転ホモジナイザーが有効であることがわかった。一方、通常疎水性であるフラーレンについても水溶化フラーレンの合成に成功した。

(3) 表面修飾—可溶分散化・単離、切断

カーボンナノロッド、ナノチューブの分離、精製には過塩素酸水溶液の使用により最も高い収率が得られた。また可溶・分散化には CHAPS のような両性イオンミセルの使用が効果的であった。

湿式酸化によりカルボン酸を導入し、ビオチンのアミノ誘導体との縮合反応を行うことにより、カーボンナノチューブはビオチン化され、良好な分散性を示した。またナノチューブをポリスチレンスルホン酸で表面修飾後、適切な濃度と塩酸添加の条件に調整することにより、アミノ表面を持つスライドガラスへ固定化することが可能になった。

C 5. カーボンナノチューブ単体の特性と応用

(1) 観察評価

高分解能透過型電顕を用いた合成、単離、形状の確認を行うとともに、特定元素の原子周囲の構造情報の得られる EXAFS により、触媒の Ni 微粒子のサイズは 4-10nm で濃度 100ppm, Ni-C 結合はダイヤモンド合成時に酷似し、単層ナノチューブ用触媒の Fe の構造は面心立方格子 (FCC) であることが見いだされた。

またエネルギー選別フィルターとして Wien filter を組込んだ EXPEEM 装置を開発した。高エネルギー分解能であるとともに空間分解能も nm オーダーであり、試料表面の状態分析と元素マッピングをガス共存下で行う in-situ 分析も可能で、微粒子や触媒の解析の強力な手段となると期待される。

(2) カーボンナノチューブの細胞認識・サイトカイン放出作用機序の解析

ヒトマクロファージ系細胞株 THP-1 細胞に対し、濃度 0.1, 0.01, 0.001ppm のナノロッド懸濁液添加刺激で、それぞれ 1600, 350, 200pg/ml の TNF- α 産生が誘導されることが EIA 法で認められた。また Toll-like receptor 2 (TLR2) を転写因子 NF- κ B 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに導入した HEK293 細胞はナノロッド添加により、濃度依存的に NF- κ B 活性を示した。

(3) カーボンナノチューブの骨芽細胞培養に及ぼす影響

ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 MG-63 細

胞に可溶化ナノロッド懸濁液を加えると、48 時間培養後、MTT 法にて測定した生細胞数は添加量に依存して増加し、24well-culture dish に 10ml 添加では約 20% の細胞増殖活性を示した。一方、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の場合は濃度に依存して生細胞数は減少し、アルカリフォスファターゼ活性も低下した。

(4) 遺伝子導入用媒体への応用

過塩素酸水溶液により精製し、両性イオンミセルにより可溶化したカーボンナノロッド、ナノチューブに対して、インターカレーターを付加することにより、プラスミドを結合できることを確認した。pCMV- β Gal 発現プラスミドをインターカレーター結合したナノロッドをリン酸カルシウム法を用いて H1299 細胞への遺伝子導入を試みたが、発現は認められなかった。

C 6. カーボンナノチューブ焼結バルク体の作製とその特性

(1) 作製

軽量不活性で機械的特性も優れると期待される多層ナノチューブおよびナノロッドを焼結固化したバルク体を作製した。

一般にカーボン材料は難焼結性であるが、日本で開発された放電プラズマシステムを用い、高純度の場合は適宜、非晶質炭素を添加することにより、2000 $^{\circ}$ C 以下の温度で多層カーボンナノチューブおよびナノロッドの焼結が可能になった。

また骨との親和性を付与するために、ナノチューブに直接ハイドロキシアパタイトを被覆はできないので、表面改質の第 1 段階として固化ナノチューブにチタンで被覆することを試み、電子ビーム蒸着法で可能になった。その上にアパタイトを水熱合成法で 50 $^{\circ}$ C の低温にて被覆することも試みた。

(2) 特性解析

高温で焼結したナノチューブでは破壊強度、弾性率が高く、弾性変形後、破断に至る典型的

な脆性を示した。添加剤を多くすると破壊強度は低下したが最大荷重示現後も破断までの変位が大きい準脆性的な挙動を示し、セラミックスとしては特異的な高い破壊靱性を示した。

(3) 生体適合性試験

これら材料の生体適合性評価として動物埋入試験を行った。ラット腹部皮下に1週埋入したナノロッド、フラーレンの試料集塊、水溶性ナノロッド、ナノチューブ焼結体はいずれも線維性結合組織に被包化され、集塊内粒子間にもコラーゲン線維の産生が多数認められた。ナノチューブ焼結体については焼結時の粘結剤量により、周囲の炎症反応に影響が見られた。

C 7. カーボンナノチューブの DNA 高分解能電顕観察用支持体への応用

酢酸アミル溶媒中で細胞破碎用の超音波機を用いて分散させたナノチューブを既製の電顕観察用有孔カーボン膜を張ったマイクログリッドですくい上げ、膜孔上に網渡しになったものを支持体として使用可能か電顕観察を行った。

C 8. ナノ磁性微粒子の生成と特性

液相反応法により、水溶液中に分散した Fe_3O_4 のナノサイズ微粒子を作製した。この微粒子の飽和磁化、保磁力等の磁気特性は粒径に依存して変化した。ナノサイズ微粒子に顕現する特異磁性はコンピュータシミュレーションにより、表面磁気異方性の影響を受けていることが示唆された。

C 9. ナノ分子構造制御高分子ゲル

大きな曲げを示すが電界下における発生力の低い Nafion については熱圧着により積層構造にすることで発生力を通常の3倍までの増加を可能にした。塩基性環境下で大伸長を示すが分解しやすいポリアクリロニトリルゲルについては高温加熱処理により耐久性を著しく向上することができた。

D. 考察

D 1. 生体適合性の微粒子サイズ依存性

チタンは金属中、最も生体親和性に富むとされ、インプラントには最もよく使用されている。しかしマクロサイズでの生体親和性に対し、ミクロな微粒子になると為害性を惹起し、その程度はサイズに依存する。細胞生存率、LDH、活性酸素、サイトカイン放出量、顕微鏡による細胞の形態変化等、*in vitro* の細胞機能性試験では、サイズが $100 \mu m$ 以上ではほぼコントロールと変わらぬ程度であるのに対し、 $100 \mu m$ 以下の範囲でサイズ依存性が顕現化し、特に細胞よりも小さな $10 \mu m$ 以下では貪食を誘発し、顕著な細胞毒性を発現した。

ICP 元素分析からイオン溶出が検出限界以下の無視できる程度であることを確認しており、溶解イオンとしての化学的効果とは異なる、微粒子の物理的サイズに由来する細胞毒性効果であることを示している。

炎症性サイトカイン $IL-1 \beta$ は図 1, 2 のように典型的な単調増加依存性を示すのに対し、 $TNF- \alpha$ では図 3 のように $10 \mu m$ 以上のチタン微粒子混和液では放出がほとんど認められず、 $3 \mu m$ 以下で急激な増加を示した。顕微鏡観察でも $3 \mu m$ 粒子では好中球に貪食が進行し、 $10 \mu m$ 以上の粒子では貪食は認められない。 $TNF- \alpha$ は貪食作用に伴い、特異的に放出されるものと考えられる。

ともに生体親和性で、ICP 元素分析でイオン溶出が無視できることを確認した Ti と溶出する Fe はよく似たサイズ依存性を示した。Ni は細胞生存率が低く、LDH 放出量は高かったが、活性酸素、サイトカイン放出量は低下し、顕微鏡では細胞の破壊が観察された。炎症性サイトカイン放出が低下したのは Ni の為害性の観点から、一見逆なように見えるが、Ni の化学的性質に基づく為害性の影響で好中球の破壊、生存率の低下が著しく、結果として放出総量が低下したものと考えられる。

in vivo 動物埋入試験では、およそ $100 \mu\text{m}$ 以上のチタン粒子では巨視的サイズのインプラントと同様の生体親和性を示すが、 $50 \mu\text{m}$ 以下では炎症性反応を惹起し、特に $10 \mu\text{m}$ 以下では貪食作用を誘発し、長期間強い炎症性反応を引き起こした。

当初、組織内に広く分散していた $3 \mu\text{m}$ 粒子が埋入期間とともに凝集、高密度化するの、好中球やマクロファージによる貪食と貪食細胞の細胞死、細胞成分の吸収を繰返すことにより微粒子の凝集と内圧の低下が起き、一方、炎症反応と細胞死によって産生されたサイトカインは線維芽細胞の分化誘導を促し、やがて粒子群全体をおおうように線維性結合組織が形成され、外圧が高まる、これらのプロセスの結果、粒子群として次第に高密度に凝集化するものと現段階では考えている。

こうした物理的サイズ効果は臨界粒径およそ $100 \mu\text{m}$ を境としてそれ以上では生体親和性を示し、それ以下ではサイズの縮小とともに細胞刺激性が亢進し、特に細胞以下のサイズの $10 \mu\text{m}$ 以下になると貪食を誘発して顕著な為害性を引き起こす点で、*in vitro* と *in vivo* の結果は定量的にもよく一致する結果となった。

通常バイオマテリアルとして扱っている $\text{mm}, \text{cm}, \text{m}$ のマクロサイズ領域ではこうした物理的効果は無視できるほど小さく、生体適合性は主としてイオン溶出による化学的効果に依存する。しかしおよそ $100 \mu\text{m}$ の臨界径以下になってくるとサイズ効果、形状効果等の物理的因子が次第に重要になり、特に細胞のサイズと同等あるいはそれ以下ではきわめて顕著になり、この傾向は μm から nm 領域まで続いている。例えば Ni のように生体為害性の強い金属ではイオン溶出による化学的効果の影響を受けるがサイズ依存性は同様に示している。生体為害性の少ない材料としては共通であるが化学的にはイオン不溶出の Ti と大量に溶出する Fe あるいは酸化物の TiO_2 と、特性の異なる微粒子のいずれも、物質によらずサイトカイン放出量

が定量的にもよく似た細胞刺激性を示すことは興味深い。この領域で微粒子による物理的サイズ効果が支配的になることを示している。

D 2. 耐摩耗性窒化チタンインプラントの開発

以上のような物理的サイズ効果が臨床的に顕在化する例として摩耗粉の問題がある。この問題に対する対策として本研究では窒化チタンに注目し、その機械的特性と生体適合性を調べた。表面窒化チタンの硬さ、引っかかり硬さ、耐摩耗性ともチタンの約 10 倍増であり、耐摩耗性は著しく改善される。一方、その微粒子の細胞毒性が高ければ生体材料として適当でないことになるが、マクロ大インプラントの生体親和性、微粒子の生体為害性ともチタンとほぼ同等の結果を示した。インプラント全体が窒化チタンの場合、ヤング率が高すぎ、脆性で衝撃力に弱いから実用的には不適當であり、表面のみ窒化した表面窒化チタンインプラントのほうがバルク体内部は金属で信頼性に富み耐摩耗性も兼ね備える点で実際的である。窒化チタンの膜厚は本研究では約 $2 \mu\text{m}$ としたが、あまり厚くなるとマトリックスのチタン金属とのコヒーレンシーを失い、容易に剥離しやすくなることを考慮すると、適切な膜厚と考えられる。

これらの結果から、チタン表面に表面窒化層を形成することにより、チタンと同等の生体親和性を有しながら、摩耗粉発生を著しく抑制できると期待され、人工関節等の骨頭摺動部を有する大腿骨置換インプラント、定期的に歯石除去作業を行う必要のあるデンタルインプラントのアバットメント部等、摩耗粉の問題に対処できる耐摩耗性インプラントとして有効であると期待される。

従来、チタンインプラントのアバットメント部（上皮貫通部）の超音波スケーラーによる歯石除去には、表面に傷をつけないために超音波スケーラーにはプラスチック製のチップを用いていた。臨床で歯石除去作業に負荷する荷重は約 50g であるが、約 $2 \mu\text{m}$ 厚の窒化チタン層

を形成することにより、500gの負荷でステンレス製チップを用いても機械的研磨傷を形成することなく除去作業が可能であることが示された(図8, 9)。臨床時の操作効率の著しい向上とインプラントの長期維持率の増大に寄与すると期待される。

D3. 可視光応答型光触媒二酸化チタンの開発と応用

従来、光触媒は紫外線を必要とし生体への応用は困難であった。今回、金属イオン光析出法というきわめて簡便な方法で可視光応答性を付与することができた。この可視光応答型二酸化チタン光触媒は日常歯科治療に用いられている470nmをピークとするコンポジットレジンの光重合照射器をそのまま使用することができ、特別な装置を必要としない点で汎用性に富むものである。

その応用として、最も代表的な齶蝕原生菌である *streptococcus mutans* に対し、85%以上の抗菌効果を示し、またヒト天然歯に対する漂白応用においても20分の照射で十分な漂白効果が得られた。

従来、歯牙漂白には35%過酸化水素水を用いるため、術式の過程で様々なリスクが存在したが、本可視光応答型光触媒を用いれば、過酸化水素水を使用することなしに、漂白効果を得ることができる。Agイオンの歯科臨床使用については以前から銀セメント、銀ポイントなどの根管治療用材料や硝酸銀による腐食、収斂作用、フッ化ジアンミン銀のう触予防作用など解離したAgイオンによる薬理作用を期待した様々な薬品が用いられてきており、また二酸化チタンは医薬品に多く用いられているから、Agイオン修飾二酸化チタン光触媒の口腔内使用に大きな問題は無いと考えられる。体内使用の可能性は今後の検討課題である。

D4. バイオ用カーボンナノチューブの開発と単体の応用

(1) バイオ用カーボンナノチューブの開発

カーボンナノチューブをバイオ応用するには現状のものでは不適當である。これはカーボンナノチューブと称しても含有率が低く、触媒としてのNi微粒子を含んでおり、また疎水性で凝集しやすく単体として取り出せない、直径はnmでも長さは数 μ mと長過ぎる、またサイズが不揃いであること等のためである。このため本年度はまず以下の問題を克服することを主たる目標に研究を行った。

- 1) 大量合成、2) 精製：アモルファスカーボン除去、3) 高純度化：触媒(Ni)除去、4) 凝集：可溶化・分散化・単離、5) サイズ：切断、6) 表面修飾：分子結合

アーク放電法を使用し、種々の触媒金属を用いることにより、単層・多層ナノチューブの大量合成が可能になり、燃焼酸化、酸処理などにより精製高純度化を達成した。

ビオチンのアミノ誘導体との縮合反応を行うことにより、カーボンナノチューブをビオチン化し、良好な分散性が得られた。ビオチン化によりカーボンナノチューブの細胞への導入の有無、局在を可視化するための金粒子の付加結合や蛍光ラベリングが可能になると考えられる。

またポリスチレンスルホン酸で表面修飾することにより、アミノ表面を持つスライドガラスへ固定化することが可能になり、光学顕微鏡下の観察が容易になり、細胞培養の担体としての使用にも応用可能である。

またナノチューブの切断には超音波のほかに高回転ホモジナイザーの使用が有効であった。

(2) 遺伝子導入用担体への応用

精製・可溶化したカーボンナノロッド、ナノチューブにインターカレーターを付加することにより、核酸を結合することが可能になり、遺伝子導入のツールとしてのバイオ応用への道が開かれた。今回、プラスミドをインターカレーター結合したナノロッドを用いて細胞への遺伝子導入を試みたが、発現が認められなかったのは、至適サイズ200nmに対し、形状が直径

200nm、長さ2 μ m と長大なためであると考えられる。

(3) カーボンナノチューブの細胞認識・サイトカイン放出機序の解析

カーボンナノロッド、ナノチューブは、微生物抗原の認識に関わることが知られている Toll-like receptor 2(TLR2) を介してヒトマクロファージ系細胞株 THP-1 細胞に認識され、転写因子 NF- κ B を活性化することにより、TNF- α 産生が誘導されることが明らかにされた。

(4) カーボンナノチューブの骨芽細胞培養に及ぼす影響

カーボンナノロッド、ナノチューブ添加により、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞とヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 MG-63 細胞の培養後の生細胞数の結果は増殖促進、抑制と相異なる傾向を示し、細胞の種類に応じた生理活性を有する可能性が示唆された。

D 5. カーボンナノチューブ焼結バルク体の作製とその特性

カーボンナノチューブの物性を利用する用途としては通常単体としての利用が念頭にあり、バルク体としての発想とその開発は本研究が初めてである。その大きな理由の一つとして炭素材料は焼結が困難で超高温で焼結を強行するとナノチューブ構造が解体し、本来目標とする材料が容易に損なわれてしまう点があった。本研究では日本で開発された放電プラズマ焼結法を用いて実現した。この方法では粉末粒子間にプラズマが発生し、焼結促進、焼結温度の低温化が図れるとされる。

ナノチューブ焼結体は2軸引張試験下で、最大荷重に達した後、一旦低下し、再度増加後、徐々に低下する準脆性的な破壊挙動を示した。この間、アコースティックエミッションの信号は連続的に発生していることから、ナノチューブ繊維が引き抜かれるプロセスが進行するためにその摩擦抵抗力により、通常のセラミックス

で見られるような亀裂の進展が阻止され、荷重を保持し続けるものと考えられる。

従来、セラミックスは金属に較べると化学的に不活性で生体適合性にすぐれてはいるものの、脆性材料で破壊しやすく信頼性に劣り、破面が鋭角状で組織を傷つけやすい欠点があった。また骨に比べてヤング率が高く、衝撃力の応力緩和が図れないために、周囲組織に過大な負担を課すことや逆に組織への重力負荷刺激が少なく、骨が菲薄化するなど、インプラントとして硬すぎる難点があった。

ナノチューブバルク体に見られる準脆性はセラミックスの機械的特性としてきわめて特異的で、今後、最適作製条件、物性の改善などさらなる改良が必要であるが、破壊靱性値やヤング率の観点から生体にやさしい新しいセラミックス生体材料になり得る可能性がある。加えて化学的に不活性で耐食性に富むから、為害性を惹起する要因は少ない。またその結晶構造から各種成長因子や薬剤等の吸蔵性にも富むと予想され、体内中で患部に近接して長期徐放する等の応用に向けた吸蔵性、徐放性も応用の可能性と考えられる。

E. 結論

チタンはマクロサイズで生体親和性を示すが、マイクロな微粒子になると為害性を惹起し、その程度はサイズに依存する。細胞生存率、LDH・活性酸素・サイトカイン放出量、細胞の形態変化等の *in vitro* 細胞機能性試験と *in vivo* 動物埋入試験はともに、臨界粒径およそ 100 μ m を境としてそれ以上では生体親和性を示し、それ以下ではサイズの縮小とともに細胞刺激性が亢進し、特に細胞よりも小さな 10 μ m 以下では食食を誘発し、顕著な細胞毒性を発現する、という点で一致した結果を示した。ICP 元素分析ではイオン溶出は認められず、物理的サイズに由来する細胞毒性効果である。

通常バイオマテリアルとして扱っている

mm,cm,m のマクロサイズ領域ではこうした物理的効果は無視できるほど小さく、生体適合性は主としてイオン溶出による化学的効果に依存する。しかしおよそ 100 μ m の臨界径以下になるとサイズ効果、形状効果等の物理的因子が次第に顕在化し、この傾向は μ m から nm 領域まで続いている。生体為害性の少ない材料としては共通であるが化学的にはイオン不溶出の Ti と大量に溶出する Fe あるいは酸化物の TiO₂ と、特性の異なる微粒子のいずれも、物質によらずサイトカイン放出量が定量的にもよく似た細胞刺激性を示した。Ni のように生体為害性の強い金属では化学的効果の影響を受けるが物理的サイズ依存性は同様に示している。 μ m ~ nm 領域で微粒子による物理的サイズ効果が支配的になることを示している。

摩耗粉が為害性を惹起するチタンの欠点の対策として、生体親和性がチタンとほぼ同等で耐摩耗性が著しく高く、摩耗粉発生を抑制できる、耐摩耗性表面窒化チタンインプラントを開発した。

また金属イオン修飾により、現在の歯科治療用光重合照射器で十分な抗菌効果と歯牙漂白効果を得ることができる可視光応答型二酸化チタン光触媒を開発した。

カーボンナノチューブのバイオ応用のために、大量合成、精製高純度化、可溶・単離・分散化、切断・サイズ制御、表面修飾方法を確立し、細胞による認識・サイトカイン放出機序の解析、遺伝子導入用担体としての試用を行った。

放電プラズマ法で作製したナノチューブバルク焼結体は準脆性的な挙動を示し、セラミックスとしては特異的な高破壊靱性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Ryuichiro KUMAZAWA, Fumio WATARI,

Yasunori TOTSUKA: Effects of particle size on cell function and morphology in titanium and nickel, Materials Transactions 43(12), 3052-3057, 2002

2) Ryuichiro KUMAZAWA, Fumio WATARI, Noriyuki TAKASHI, Yukihiko TANIMURA, Motohiro UO, Yasunori TOTSUKA: Effects of Ti ions and particles on cellular function and morphology of neutrophils, Biomaterials 23(2002) 3757-3764

3) Yutaka Tamura, Atsuro YOKOYAMA, Fumio WATARI, Motohiro UO, Takao KAWASAKI: Mechanical properties of surface-nitrided titanium for abrasion resistant implant materials, Materials Transactions 43(12),3043-3051,2002

4) Yutaka TAMURA, Atsuro YOKOYAMA, Fumio WATARI, and Takao KAWASAKI: Surface Properties and Biocompatibility of Nitrided Titanium for Abrasion Resistant Implant Materials, DENTAL MATERIALS JOURNAL 21(4),355-372,2002

5) 谷村幸広、亘理文夫、宇尾基弘、戸塚靖則：金属イオン修飾による二酸化チタン光触媒の可視光応答性付与と歯科応用のための基礎研究、歯科材料・器械 21(6),342-350,2002

6) 亘理文夫、近藤英臣、宮尾里香、大森 守、大久保 昭、平井敏雄、横山敦郎、宇尾基弘、田村 豊、川崎貴生：FGMインプラントの特性に及ぼすSPS焼結圧の効果と生体適合性、粉体および粉末冶金、49(12), 1063-1069, 2002

7) 小西順子、亘理文夫、大川昭治、宇尾基弘、佐野英彦：冷間等方加圧法を用いた陶材インレーの焼成後収縮に及ぼす中間酸化物添加の影響、歯科材料・器械 21(6), 357-367,2002

8) 小西順子、川本千春、小松久典、佐野英彦、亘理文夫：冷間等方加圧法で作製した陶材インレーに及ぼす脱バインダー化球状粉末の影響、日本歯科保存学雑誌 45(6),1213-1222,2002

9) 亘理文夫：先進歯科材料に関する最近の動向、日本学術振興会・材料の微細組織と機

能性第133委員会第174回研究会資料,
p.13-18,2002

2. 学会発表

1) 谷村幸広、熊沢龍一郎、戸塚靖則、宇尾基弘、菅原敏、大川昭治、亘理文夫：イオン修飾二酸化チタンの可視光応答性光触能と抗菌性、2002年3学協会北海道支部研究発表会講演要旨集、p.19,2002

H14/1/16, 札幌（北海道大学工学部）

2) 小西順子、川本千春、佐野英彦、宇尾基弘、亘理文夫：球状粉末および中間酸化物を用いたCIP成形歯科用陶材、平成13年度日本金属学会・日本鉄鋼協会両支部合同冬季講演大会概要集、p.39,2002

H14/1/17-18, 札幌（北海道大学学術交流会館）

3) 宇尾基弘、亘理文夫：X線分析顕微鏡による生体軟組織埋入金属試料の溶出挙動の定量評価、平成13年度日本電子顕微鏡学会北海道支部学術講演会予稿集、p.5,2002

H14/2/9, 札幌（北海道大学歯学部）

4) 近藤英臣、宮尾里香、横山敦郎、川崎貴生：傾斜機能型歯科インプラントの機械的・組織学的特性、北海道外科学会誌 47(1),80,2002
第14回代用臓器研究会、H14/3/2, 札幌（北海道大学学術交流会館）

5) 田村一央、熊沢龍一郎、亘理文夫、戸塚靖則：チタン微粒子のサイズに依存性した生体為害性の評価、北海道外科学会誌 47(1),81,2002
第14回代用臓器研究会、H14/3/2, 札幌（北海道大学学術交流会館）

6) C.KAWAMOTO, J.KONISHI, F.WATARI, H.SATO: Improved Contraction of Porcelain Inlays by CIP Method, J.Dent.Res.81,251,2002

80th IADR, San Diego, California, USA, March 6-9, 2002

7) S.MATSUO, F.WATARI, N.OHATA, M.UO, S.OHKAWA, T.SUGAWARA: Fabrication of Functionally Graded Composite Resin Post by Laser Lithography, J.Dent.Res.81,323,2002

80th IADR, San Diego, California, USA, March 6-9, 2002

8) 谷村幸広、熊沢龍一郎、戸塚靖則、宇尾基弘、大川昭治、菅原敏、亘理文夫：イオン修飾二酸化チタンの可視応答性光触媒能の検証、歯科・材料器械 21(S39),107,2002

平成14年度春期第39回日本歯科理工学会学術講演会、H14/4/13-14, 東京（日本大学歯学部）

9) 小西順子、川本千春、佐野英彦、宇尾基弘、亘理文夫：冷間等方加圧法で作製した陶材インレーに及ぼす粉末の影響、歯科・材料器械 21(S39),155,2002

平成14年度春期第39回日本歯科理工学会学術講演会、H14/4/13-14, 東京（日本大学歯学部）

10) 宮尾里香、亘理文夫、横山敦郎、田村豊、近藤英臣、宇尾基弘、川崎貴生、大森守、大久保昭、平井敏雄：FGMインプラントの特性に及ぼすSPS焼結圧の効果と生体適合性、粉体粉末冶金協会平成14年度春期大会（第89回講演大会）講演概要集、p.89, 2002

H14/5/27-29, 東京（早稲田大学・国際会議場）

11) 亘理文夫：先進歯科材料研究に関する最近の動向、日本学術振興会・材料の微細組織と機能性第133委員会第174回研究会資料、p.13-18,2002

H14/7/26, 札幌（北海道大学工学部）

12) 近藤英臣、横山敦郎、田村豊、川崎科貴生、宇尾基弘、大川昭治、菅原敏、亘理文夫：窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの作製と評価、歯科・材料器械 21(S40), 33, 2002

平成14年度秋期第40回日本歯科理工学会学術講演会、H14/8/31-9/1, 長野（塩尻市文化会館）

13) 宇尾基弘、菅原敏、大川昭治、亘理文夫：エックス線分析顕微鏡を用いた口腔内金属の迅速分析法、歯科・材料器械 21(S40),39,2002
平成14年度秋期第40回日本歯科理工学会学術講演会、H14/8/31-9/1, 長野（塩尻市文化会館）

- 14) 田村一央、高師則行、宇尾基弘、大川昭治、菅原敏、戸塚靖則、亘理文夫：金属微粒子の細胞機能性試験と粒径効果、*歯科・材料器械* 21(S40),94,2002
平成14年度秋期第40回日本歯科理工学会学術講演会, H14/8/31-9/1, 長野(塩尻市文化会館)
- 15) 亘理文夫：「ナノチューブ、ナノマイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用」の課題、厚生労働科学研究補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業 ナノメディシン分野「ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用」(課題番号：H14-ナノ-021)
平成14年度第1回目標策定研究発表会抄録集、H14/9/9-10, 赤井川(ヤマハリゾートキコロホテルピアノ)
- 16) F.WATARI: Development of Functionally graded Implant and dental post for bio-medical application, Abstracts of the 7th Int. Symp. on Functionally Graded Materials FGM2002, p.11, 2002
Oct.15-19, Beijing, China
- 17) 亘理文夫、松尾晋吾、佐藤範幸、上田康夫、大畑昇：傾斜機能型デンタルポスの応用緩和効果、第14回傾斜機能材料国内シンポジウム<FGM2002> 講演要旨集、p.25, 2002
H14/11/19-20, 名古屋(財団法人ファインセラミックセンター)
- 18) 田村一央、戸塚靖則、亘理文夫：チタン粒子が及ぼす細胞為害性のサイズ依存と粒形効果, Abstracts of JADR, p.26, 2002
- 第50回国際歯科研究学会日本部会(JADR) 総会・学術大会, H14/11/30-12/1, 仙台(仙台市情報・産業プラザ)
- 19) 亘理文夫：ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用、平成14年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業 萌芽的先端医療技術推進研究 ナノメディシン研究成果発表会要旨集, p.61-62, 2003
H15/2/5, 東京((財)がん研究振興財団内国際研究交流会館)
- 20) 亘理文夫：「ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用」の課題、厚生労働科学研究補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業 ナノメディシン分野「ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用」(課題番号：H14-ナノ-021) 平成14年度第2回研究発表会抄録集、H15/2/17-18, 岐阜(岐阜観光ホテル十八楼別館・岐阜市生涯学習会館)
- 21) 田村一央、高師則行、古月文志、宇尾基弘、田路和幸、ロスカ・イオシフ、戸塚靖則、亘理文夫：ナノ・マイクロ微粒子が及ぼす生体為害性の評価、第15回代用臓器研究会抄録集, 2003
H15/3/21, 札幌(札幌医科大学)
- 22) 近藤英臣、横山敦郎、宇尾基弘、亘理文夫、川崎貴生：放電プラズマ焼結法で作成した傾斜機能型インプラントの機械的・組織学的評価、第15回代用臓器研究会抄録集, 2003
H15/3/21, 札幌(札幌医科大学)