

参考文献

1. L. Zhao and L. Gao, *Carbon*, 42 (2004) 423-426.
2. G. D. Zhan, J. D. Kuntz, J. Wan and A. K. Mukherjee, *Nature, Mater.*, 2 (2003) 38-42.
3. R. Z. LeGeros and J. P. LeGeros, Dense hydroxyapatite, in *Advanced Series in Ceramics vol. 1: Introduction to Bioceramics* (Eds. L. L. Hench and J. Wilson), World Scientific, NJ, USA, 1991, 139-180.
4. H. Conrad, *Mater. Sci. Eng.*, A287 (2000) 276-287.
5. M. Omori, *Mater. Sci. Eng.*, A287 (2000) 183-188.

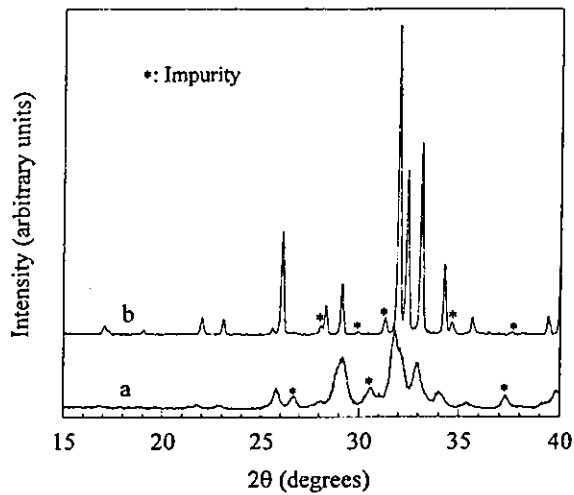


Fig. 1 XRD pattern of the products reacted in furnace for 1 h in air, (a) at 600°C and (b) at 1200°C.

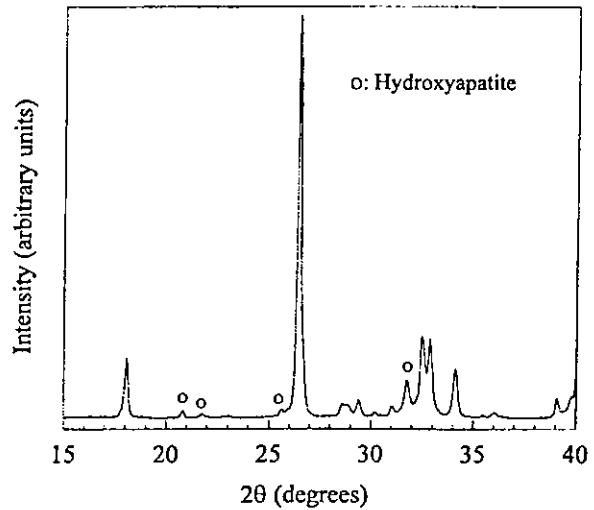


Fig. 2 XRD pattern of the product reacted at 300°C at 600 MPa by SPS.

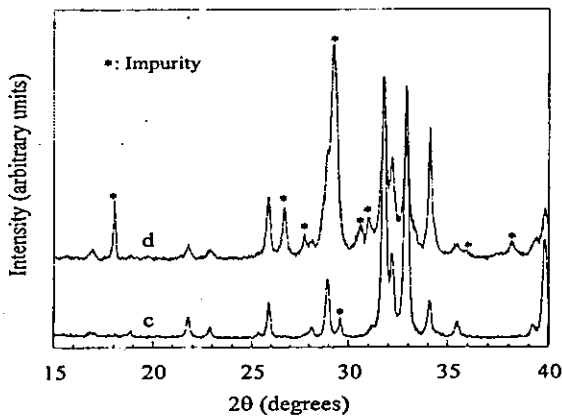


Fig. 3 XRD pattern of the products reacted at 500°C by SPS, (c) at 670 MPa and (d) at 20 MPa.

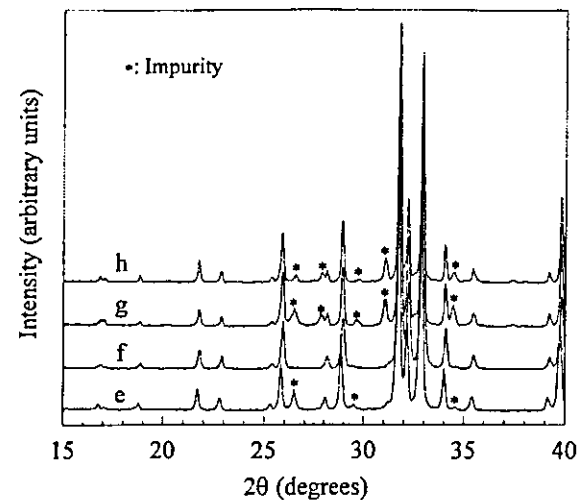


Fig. 4 XRD pattern of the products reacted for 10 min by SPS, (e) at 600°C at 600MPa, (f) at 700°C at 480 MPa, (g) at 1000°C at 120 MPa and (h) at 1150°C at 20 MPa.

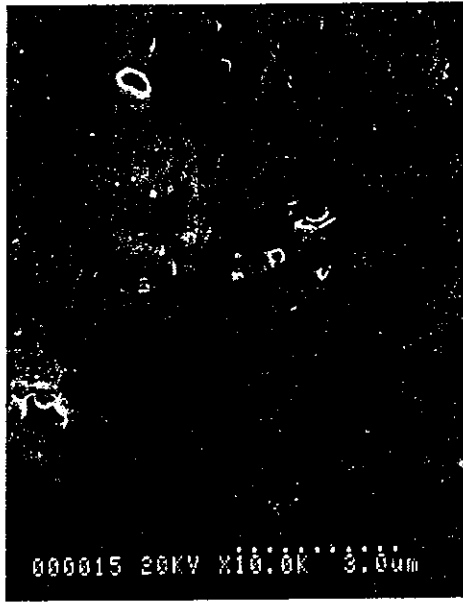


Fig. 5 SEM image of the product reacted at 500°C at 670 MPa by SPS.

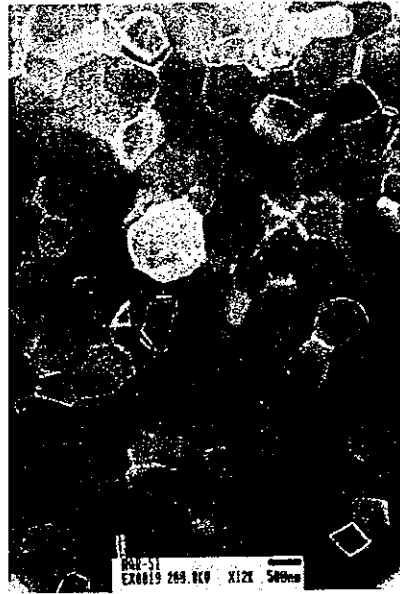


Fig. 6 TEM image of the product reacted at 1150°C at 20 MPa by SPS.

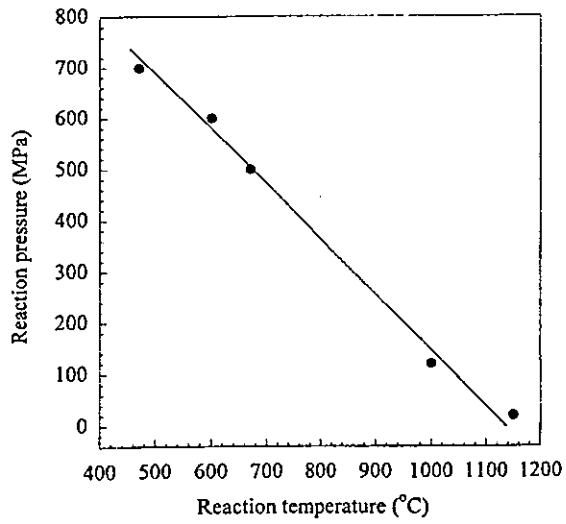


Fig. 7 Temperature vs. pressure for HA formation by SPS.

カーボンナノチューブによる

細菌の吸着

木浦 和人*1、野田坂 佳伸*2、
田路 和幸*3 亘理 文夫*4、柴田 健一郎*1

北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学
講座*1 中央研究部*2 口腔健康科学講座*4
東北大学大学院工学研究科 地球工学専攻
素材機能工学分野*3

A. 目的

我々は、カーボンナノチューブ (CNT) が様々な物質を吸着するのではないかと推測している。そこで、本研究では CNT が全唾液あるいは細菌培養液中の細菌を吸着するかどうかを調べた。

B. 方法

1. CNT による全唾液中の細菌の吸着

全唾液をマイクロチューブに 1 ml ずつ分注し、CNT (NanoLab 社製の NWCNT, NO.4、未精製品) をそれぞれ 5 mg、10 mg、20 mg を加え、vortex ミキサーで混合した。1 時間静置した後、上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^3 \sim \times 10^6$) 後、BHI 寒天培地に 100 μ l 塗抹し、15 時間後にコロニー数をカウントした。

2. CNT による *Streptococcus mutans* JC2 の吸着

BHI 液体培地に NWCNT を 5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml になるように加え、 4×10^6 cfu の *S. mutans* を接種し 37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。3、6、9、12、15 時間後に vortex ミキサーで 10 秒間混合し、1 分間静置してから上清を回収した。回収

した上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^3 \sim \times 10^8$) 後、BHI 寒天培地に 100 μ l 塗抹し、48 時間嫌気培養後にコロニー数をカウントした。また、15 時間後の培養液中の CNT を回収し、細菌と CNT との吸着の様子を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

3. CNT による *Escherichia coli* K12 の吸着

普通ブイヨン培地に NWCNT を 5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml になるように加え、 2×10^5 cfu の *E. coli* を接種し、37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。2、4、6、8 時間後に vortex ミキサーで 10 秒間混合し、1 分間静置してから上清を回収した。回収した上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^5 \sim \times 10^{10}$) 後、普通寒天培地に 100 μ l 塗抹し、10 時間培養した後にコロニー数をカウントした。

C. 結果ならびに考察

全唾液中の生菌数 (3.6×10^7 cfu/ml) は CNT の処理濃度依存的な減少傾向を示し、最も高濃度 (20 mg/ml) の CNT 処理で生菌数が 2.6×10^6 cfu/ml まで減少していた。また、*S. mutans* ならびに *E. coli* の培養液に種々の濃度の CNT を加えたところ、CNT の濃度に依存して培養上清中の生菌数が減少していた。実際、CNT の濃度に依存して培養上清の透明度が増していることが肉眼でも観察された。SEM の結果では、*S. mutans* が CNT のファイバーに入り込んでいる様子や菌体に CNT が絡みついている様子などが観察された。

以上のことから、CNT は細菌の菌体を吸着することができるものと推測される。

High Resolution Electron Microscopy of Some Fiferous Minerals

- Chrysotile Asbestos and Sepiolite -

Keiji Yada

153-4 Yamazaki Goshizawa Aomori 030-01

Aomori Public College

高分解能電子顕微鏡による繊維状鉱物の観察

クリソタイルとセピオライト

矢田慶治 青森公立大学 経営経済学部

はじめに

電子顕微鏡で結晶の格子が格子縞（または格子像）として直接見られたのは、1956年 Menter[1]による銅フタロシヤニン (Cu-phthalocyanine)の格子像 (10-12Åの縞)が最初で、この時、転位(dislocation)の像と思われる途中で消えている縞が観察され、格子欠陥の直接観察の可能性が示された。それ以来、更に狭い格子間隔を持つ物質の像を撮影する努力が続けられ、現在は1Å以下の狭いものまで撮影できるようになった[2、3]。また、これと平行して、結晶試料の厚さ、対物レンズの焦点合わせなど特定の条件を満たせば、結晶の構造解析(structure analysis)を、X線による方法と相補的なものとして、微視的に行い得ることが確かめられた。ここでは、筆者が格子像法を用いて行った温石綿(chrysotile asbestos)とセピオライト(sepiolite)の微細構造の研究結果について述べる。最後に、これらの繊維状鉱物が生体に与える効果について述べる。

1. chrysotile asbestos

1-1. 蛇紋石 (serpentine)の分類及び構造

石綿 (asbestos) は繊維状の粘土鉱物の総称で、砕いて綿状になるのでその名があり、耐熱性の保温材、構造物補強材などの種々の用途に使われ、日常生活にもなじみの深いものであるが、その主成分は、学名をクリソタイル・アスベスト (chrysotile asbestos 温石綿) と呼ぶ蛇紋石 (serpentine) に属する層状珪酸塩鉱物である。石綿としてはこの他に、鉱物学的に別なamphiboleに属するcrocidolite, amositeなどがあるが、ここでは取り扱わない。

蛇紋石には多形 (polytype) の関係にある複数の鉱物が存在し、Whittaker と Zussman[4]によって、大別して図1のように分類されている。これら蛇紋石の組成は $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ で、その構造は図2のように、Si-O₄ 4面体 (T相) と Mg(OH)₂ 8面体相 (O相) の二重層が単位をなして重なったものである。この二重層間はファンデルワールス力で結合し、その間には相間域Iが作られている。これは代表的な粘土鉱物のカオリンのAlイオンをMgイオンで置き換えた構造であり、リザルダイトは六角板状、アンチゴライトは短冊状もしくは板状の結晶である。これらT相とO相のそれぞれの面内の格子定数 a、bには、次のように約5%の不一致があるため、

	a (Å)	b (Å)
Mg-OH sheet (brucite)	5.39	9.33
Si-O sheet (kaolinite)	5.14	8.93
misfit	4.86%	4.47%

その不適合 (misfit) を緩和するために図 2 の様に格子面が湾曲し、多形が生ずるものと考えられている。図 2 の (1) はクリソタイル、(4) はアンチゴライトに対応した模式図である [5]。

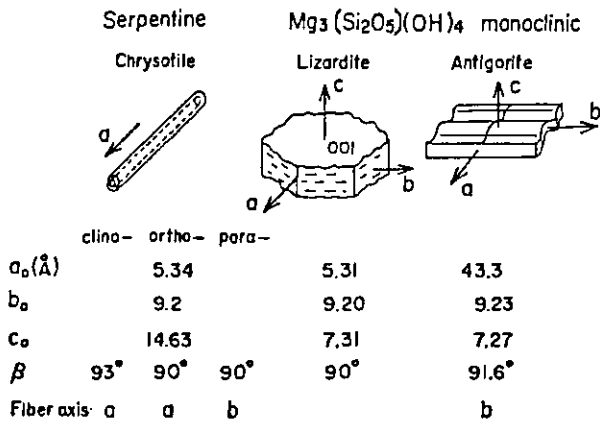


図 1 蛇紋石 (serpentine) の多形の分類

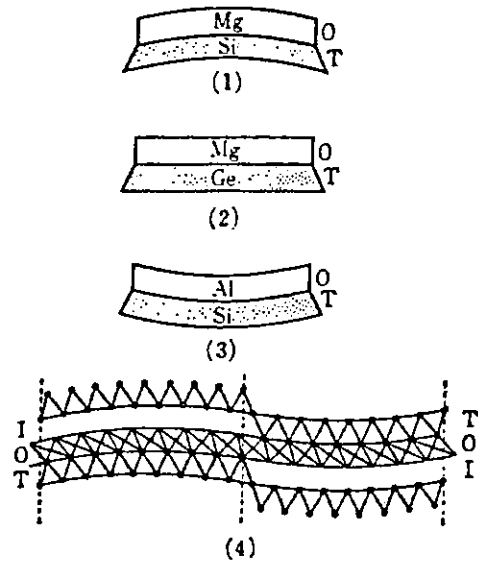


図 2 珪酸塩層の湾曲の例。
(1) はクリソタイル, (4) はアンチゴライトに対応。

1-2. 天然クリソタイルの微細構造

1950年頃から電子顕微鏡及び電子回折による観察が行われ、クリソタイル繊維が中空円筒状をなしていることが確かめられたが、それがすべての繊維について正しいかどうか、円筒の中心部が完全に中空かどうか、円筒を形成する格子面が同心円か螺旋かという点で疑問が残されていた。また、X線による解析から知られている図 1 の clino-, ortho-, para-chrysotile の 3 種類が、高分解能電子顕微鏡による格子像でその構造状の特徴を観察できるかどうか興味ある問題であった。筆者は、繊維をメッシュに載せて繊維に垂直な方向から観察する普通の方法に加えて、繊維束をダイヤモンド・ナイフを用いて超薄切片 (ultra thin section) にして繊維軸に平行な方向から観察する方法を採用して、これらの問題を解明した [6, 7]。

図 3 はカナダ産クリソタイルの 1 本の繊維の典型的な格子像である。両側の (002) の 7.3 Å の縞、幾分明るく見える中央部を走る (200) の 4.6 Å の縞、および斜めに走る 4.6 Å の縞が見られるが、これは典型的な clino-chrysotile で、その電子回折像は図 4 の (a) に示してある。多くの繊維についてこの (200)

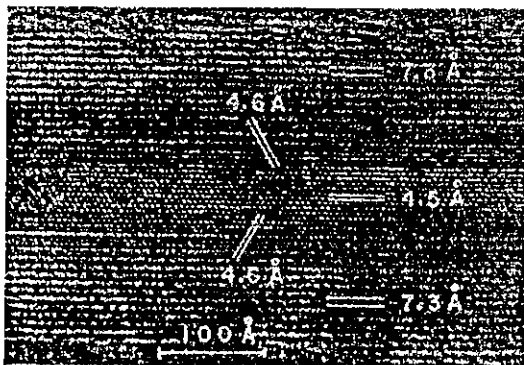


図 3 典型的な clino-chrysotile の格子像
(カナダ, Jeffrey 産)

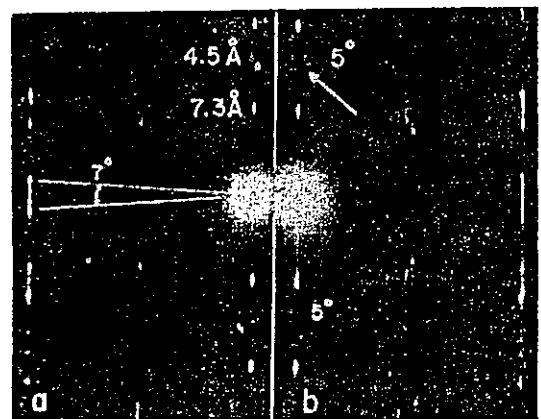


図 4 1 本のクリソタイル繊維の電子回折像。
(a) はねじれていない clino-chrysotile,
(b) はいく分ねじれて巻いた clino-chrysotile。

の4.5Åの格子縞を観察した結果、この縞が数度くらいまで傾いているものがあることが知られた。これは格子面が幾分螺旋状にねじれて巻いていることを示すもので、図4(b)はそのようなねじれた繊維の回折像で、図5は格子像の1例である。このねじれ角の分布は産地によってかなりの相違がある。

繊維軸がb方向をなしている para-chrysotile も頻度は非常に小さいが、格子像で4.5Åの縞が7.3Åの縞にほぼ直角に走っていることから識別できる。一方、 $\beta = 90^\circ$ をなす ortho-chrysotile は、外見上 clino-chrysotileと全く同様な中空の繊維で、その(200)の2.7Åの格子縞が繊維軸と直角になっているか、あるいは $\beta = 93^\circ$ の clino-chrysotile に期待される分だけ傾いているかを観察できれば、格子像から直接個々の繊維について知ることが出来る筈である。しかしこの2.7Åの縞は狭いためコントラストが低く、観察が困難であるが、後で述べるように画像処理によって識別できる。

繊維の中央部は、一般に幾分明るく見えて中空状になっていることを暗示しているが、繊維によっては図3に見られるように部分的に明暗があり、非晶質のもの(amorphous material)が所々詰まっているものがある。

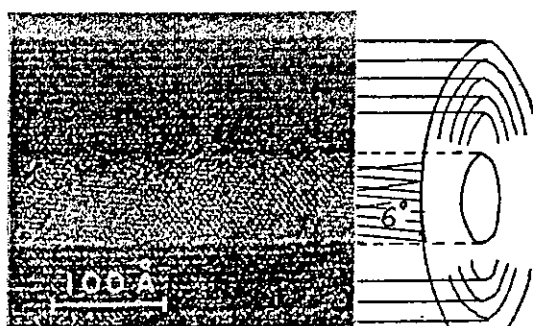


図5 約6°ねじれて巻いたクリソタイル繊維の格子像

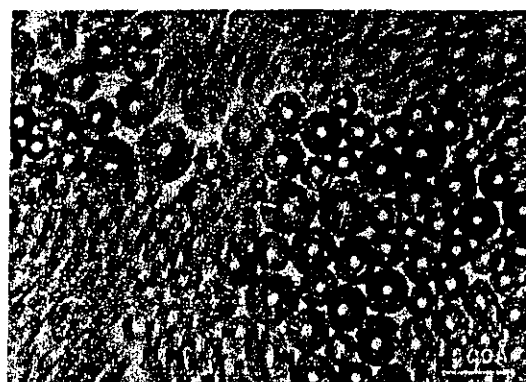


図6 クリソタイル繊維束の超薄切片像(南アフリカ, Transvaal 産)



図7 種々の成長様式を示す超薄切片像(アリゾナ, Globe 産)

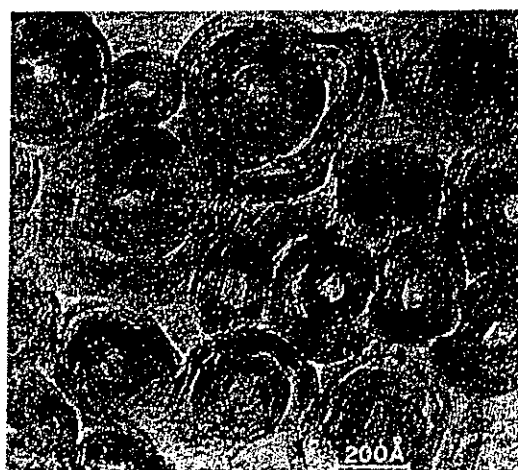


図8 多段階成長を示す超薄切片像(オーストラリア, Tasmania 産)

これらの繊維がどのような状態で束になっているか、また、個々の繊維の断面がどのような状態になっているかを、超薄切片で観察した結果を次ぎに述べる。超薄切片作製にはダイヤモンド・ナイフを用い、樹脂で包埋した繊維束にほぼ完全に直角に切れているものを探して写真撮影をする。図6は、南アフリカTransvaal産のものゝ断面の例を低倍率で示す。格子像は見えないが、この試料は非常に太さの揃った中空の繊維が束になっていることがわかる。

図7はアリゾナGlove産のもので、種々の成長模様がみられる。Aは普通の円筒状、Bは多重螺旋、Cは2組の多重螺旋の組み合わせ、Dは終端を持つ格子面を中心にして回りを取り巻いた2段階成長、Eは繊維間にはさまれている湾曲しただけのものである。図8はオーストラリアのTasmania産のもので、2~3回に分かれて成長したと思われる痕跡があり、太さにかなりのばらつきがみられる。図9は同心円と多重螺旋の典型的な格子像を示すもので、Transvaal産のものであるが、上段は同心円、下段の左は一重の螺旋、右は多重螺旋を示す。このように

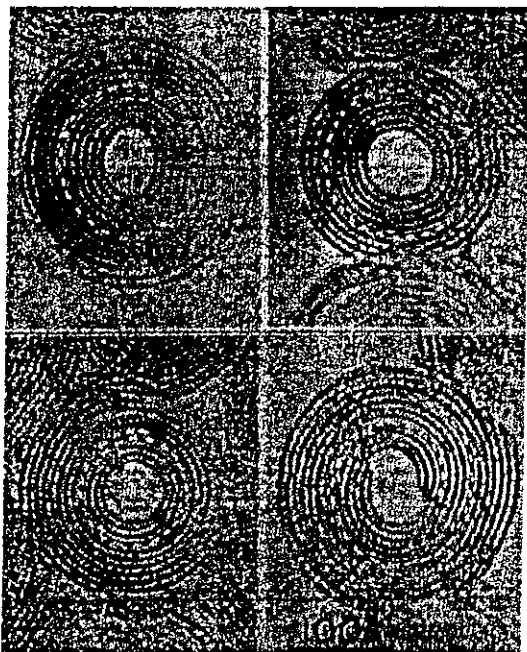


図9 クリスタル繊維の断面に見られる同心円構造および螺旋構造(南アフリカ, Transvaal産)

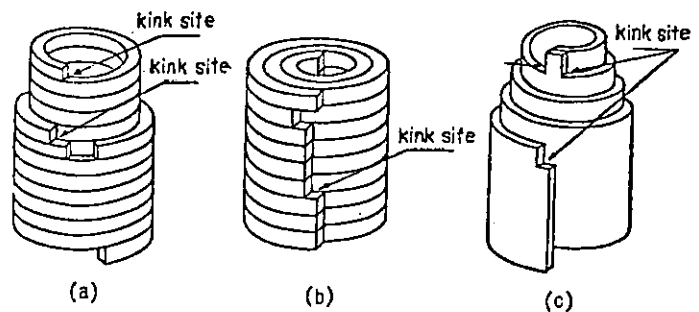


図10 JagodzinskyとKunzeによるクリスタルの成長のモデル

表1 格子面の同心円構造および螺旋構造の分布

sample	concentric structure (%)	spiral structure (%)				total number examined
		single	double	triple	quadruple	
Coalinga, California	28	42	16	11	3	36
Transvaal, S. Africa	54	25	19	2	0	43
Tasmania, Australia	13	33	13	13	27	15
Cuddapa, India	8	30	24	14	5	37

して、断面の格子像から同心円、螺旋の別を幾つかの産地のものについて調べたのが表1である。格子像で明確に判定できる繊維の数は十分大きなものでないが、Transvaalのものは同心円が多く、他方、Tasmaniaのものは多重螺旋が多いなど、成長条件によって異なる特徴をもつことがわかる。

1-3. 人工クリソタイルによる成長機構の解明

クリソタイルの成長機構について Jagodzinski と Kunze [8] は、図10に示すようなモデルを提案した。この図は初期の結晶核の状態を示すもので、(a)は結晶面が同心円状に巻いているが、軸方向に分子的な食い違い（キンク・サイト）が生じているもの（axial dislocationと呼んでいる）で、このキンク・サイトに分子が次々に付くことにより、長さの方向に成長する。(b)は半径方向に分子的な食い違いが生じているもの（radial dislocation）で、太さが増す。(c)はこの両方の機構を兼ね備えたもの（coupled dislocation）である。この考えで、前節で述べた同心円や螺旋の構造をよく説明できる。実際にこの考えを支持する成長の自然端面と思われる像も、図11に示すように得られた。(a)は低倍率像、(b)はその拡大像で、繊維の外壁は分子的規模で完全に綺麗であること、また、繊維の端から2~3枚の格子面が巻いてできた円錐状をなしていることがわかる。他方、図7のDやEの成長様式のように説明困難のものもあり、実際にこれらの結晶核がどの様にして生成されるかについての疑問は、依然として残る。これらのことを解明するため、制御された条件下で、クリソタイルを人工的に合成してその初期状態を観察した[9]。

クリソタイルの合成はいわゆる水熱合成法によるもので、今まで出発材料の異なる幾つかの方法による多くの研究があり、電子顕微鏡による研究も行われているが、いずれも初期状態の観察ではなく、低倍率、低分解能のもので、クリソタイル繊維の確認程度にとどまっていた。

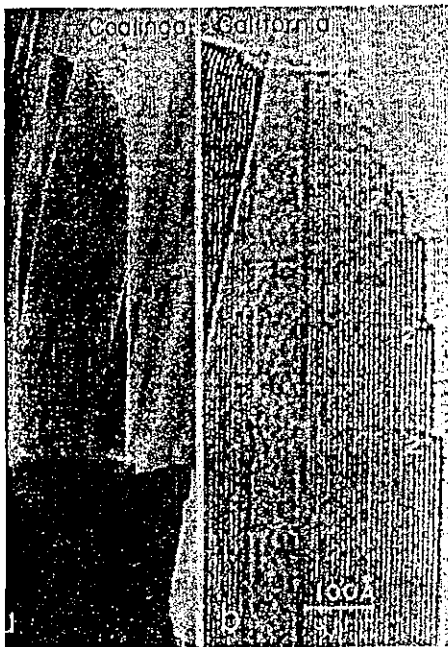


図11 成長の端面を示すと
思われる格子像

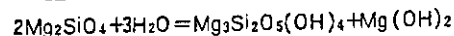
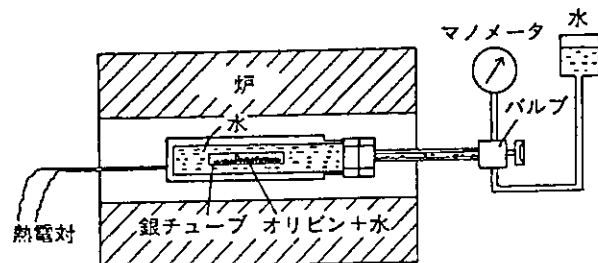


図12 serpentine 合成の装置の略図および反応式

図12は実験室規模の合成装置の略図を示すもので、出発材料として天然オリビンを使用した。図の下に反応の式を示してある。天然オリビンの粉末50mgを0.1ccの水と一緒に銀チューブに封じて圧力容器に入れ、それを予め所定の温度に上げた炉で、所定の時間及び圧力で熱処理を行う。熱処理後は冷水で急冷して室温に戻し、生成物の電顕観察を行った。合成は中性のほかに、HCl及びNaOHを用いて酸性及びアルカリ性にした場合についても行った。圧力はすべて700気圧に保った。

図13は中性、300℃で、(a)は30分、(b)は2時間の処理をしたものである。(a)ではオリビン粒子の表面に数100Åの広さの膜状晶が出来ている。2時間後の(b)では、これが数層の厚さでかなり湾曲している。矢印のものは3分子層の厚さで、すでに円錐系に巻いているもので、矢印の方向に7.3Åの層にはほぼ直角に4.5Åの縞が見られることから、para-chrysotileの特徴を示している。

図14は300℃強アルカリ性の場合の例で、(a)は30分、(b)は2時間のものである。アルカリ性の場合にはクリソタイルの成長が促進され、天然のものと同様なまっすぐな繊維が多く生成される。

図15は酸性で300℃、30分の場合のものである。酸性の場合には、膜状晶が中性の場合よりもさらに広がること、母体のオリビンと接している根元の部分では、層の間隔が広いこと、また、Cの部分にみられるように初期の膜は母体のオリビンと特定の優先方位を持って成長するらしいことがわかる。この膜状晶は、図16の(a)のように5時間ではまだ膜状のものが多いが、10日経った(b)ではほとんどが円錐状に巻いた繊維になっている。この円錐状のものは、BatesとComer[10]によって合成クリソタイルに見い出されており、cone-in-cornと名付けられているが、天然にはほとんど無く、人工クリソタイルに特徴的なものである。

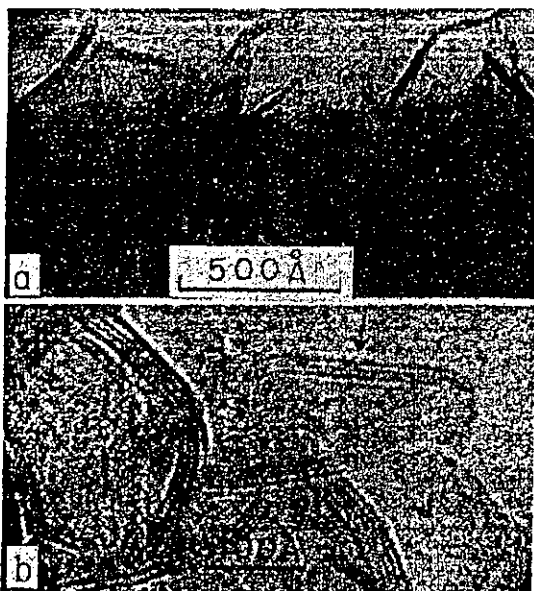


図13 中性、300℃での成長初期。
(a) 30分、(b) 2時間。

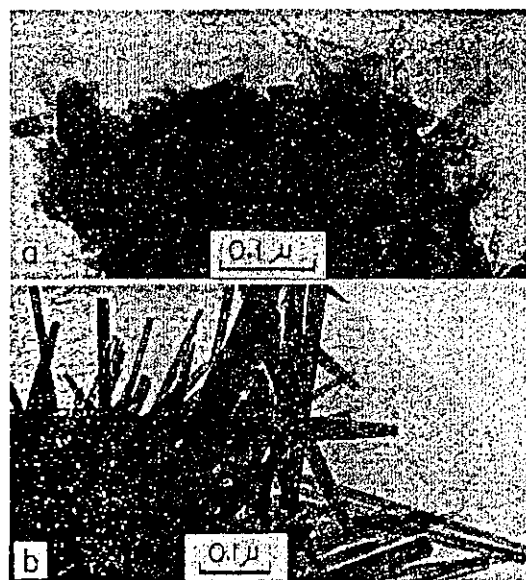


図14 強アルカリ性、300℃での成長初期。
(a) 30分、(b) 5時間。

さらに、人工クリソタイルの大きな特徴として、天然には非常に少ない *para-chrysotile* が多数生成される。図 17 はその例を示す。0.3 N HCl, 400°C, 10 日間の条件で得られたもので、*cone-in-cone* でしかも 4.5 Å の縞が 7.3 Å の縞に直角な *para-chrysotile* の特徴を明瞭に示している。



図 15 強酸性, 300°C, 30 分での成長の初期状態

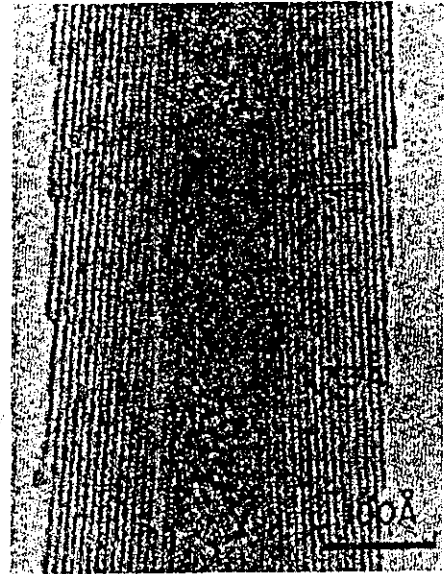


図 17 強酸性, 400°C, 10 日間の反応で得られた典型的な *para-chrysotile*.

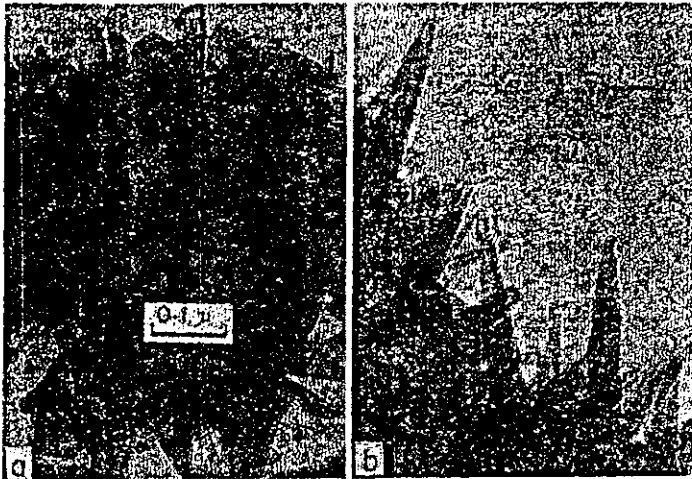


図 16 強酸性, 300°C での成長。
(a) 5 時間, (b) 10 日間。

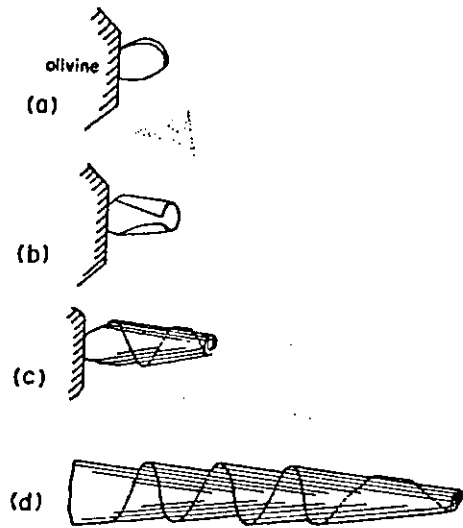


図 18 合成クリソタイルの成長のモデル

以上述べた初期状態の観察から、クリソタイルの成長機構として図 18 のようなモデルが考えられる。まず、20～30 分の水熱反応によって、(a) のようにオリビンの表面に *serpentine* の数層程度の厚さの膜状晶が生成される。これは時間と共に湾曲するが、その仕方は溶液の pH に関係があり、アルカリ性の場合には膜状に成長を始めるごく初期から円筒をなすように湾曲し、他方、酸性の場合にはある程度広い膜状に広がった後、円錐もしくは円筒をなすように湾曲する傾向がある。湾曲の程度が次第に進み、(b) では円錐状になった様子を示すが、

円筒形に巻くことが多いアルカリ性の場合など、完全に同心円に接合することもあり得る。しかし、一般には重なり会う可能性の方が大きいから、螺旋状に巻いた構造をとり、薄肉の中空もしくは円錐が出来る。最初の膜が何層もの厚い場合には、断面が多重螺旋になる。オリビンが分解して生成される serpentine 分子のうち、熱水中を拡散して膜に達したものは膜面に沿って動き、膜の端のキंक・サイトに落着くであろう。このため、円筒の内側についた分子は中空部分を次第に埋めていき、一方、円筒の外側についた分子は次第に太さを増していき、ある程度太くなると内部応力が増加すると、周りにクリソタイル繊維が密生して互いに規制され、ほぼ一定の太さに落ち着く。最初の膜状晶の厚さが厚く、断面が多重螺旋をなしているものの方が太くなる可能性が大きい。また、先端まで拡散した分子は、円筒の長さを増すことになる (c)。これは一種の tip growth といえる。

他方、円筒に巻いた根元、つまりオリビンと chrysotile の界面では、serpentine 分子が距離的に近いから、界面でのキंक・サイトにより多く落着くであろう。同時にオリビンは分解して、その表面は図に示すように後退していき、根本から円筒を押し上げる形で長くなる root growth の挙動を示すことになる。遂にはオリビンの消失とともに円筒状クリソタイル繊維の成長が終わる (d)。実際には多数の核成長が同時に起こり、密生したクリソタイルになる。図 14 (b) や図 16 (b) はその例である。大きな母岩に亀裂が生じ、そこに熱水が侵入して serpentine 化が起こる天然の成長の場合には、多数の結晶核がびっしり揃って生成されるので、互いに成長方向の揃ったものになる。

図 19 は、上述の典型的な成長模様を示す繊維とその格子像と電子回折像を示す。この回折像で左右に 2 個ずつ見られる回折点は $\{002\}$ の 7.3 Å に対応するもので、円錐のため上下に分離しているが、さらに、上側の回折点が左右とも中心点に数%近づいていることが見られる。これは、電子線が物質に入る時と出る時に起こる屈折現象によるもので、ここで問題にしている丸い繊維の場合、端に行くにつれて著しい効果をもたらし、回折点の移動を生じていることを示している)。

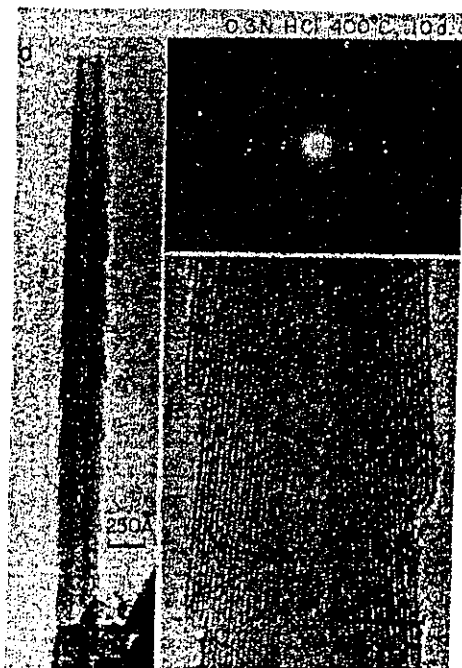


図 19 合成クリソタイルの cone-in-cone 成長の典型的な例。(a) 低倍率像, (b) 電子回折像, (c) 拡大像

1-4. クリソタイルの格子欠陥

clino-chrysotile と para-chrysotile の原子配列は X線によって図 20 のように求められている。図 21 は高分解能の電顕像に画像処理を施したもので、Mg と Si の原子が分解されていて各々モデルと対比できることが知られる [11]。図 22 は clino-chrysotile と para-chrysotile の二つの構造が一本の繊維の中に共存している例を示すもので高分解能の電子顕微鏡によってはじめて知られたことである [12]。

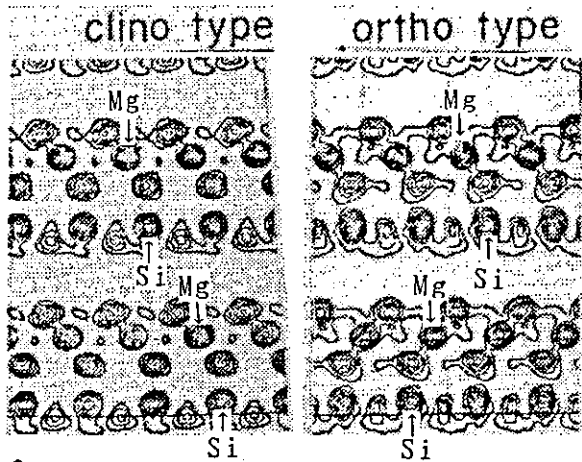


図 20 A comparison between the Fourier projections of clino- and orthochrysotile.

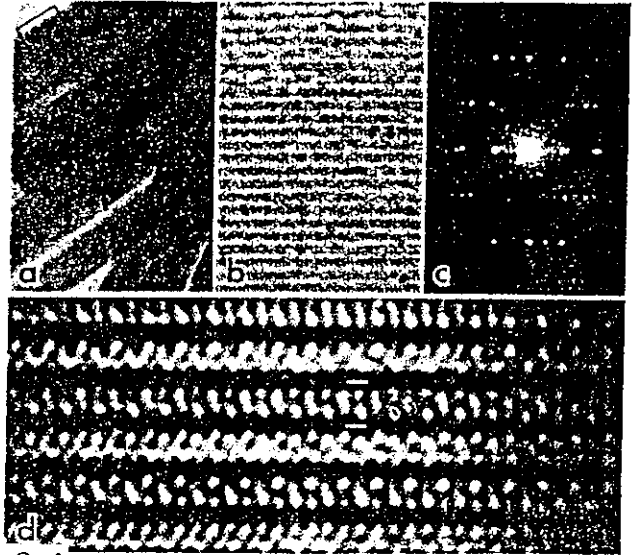


図 21 Lattice images (a and b), the corresponding optical-diffraction pattern (c) and the processed image by optical filtering (d) of orthochrysotile (C-3, M 28002).

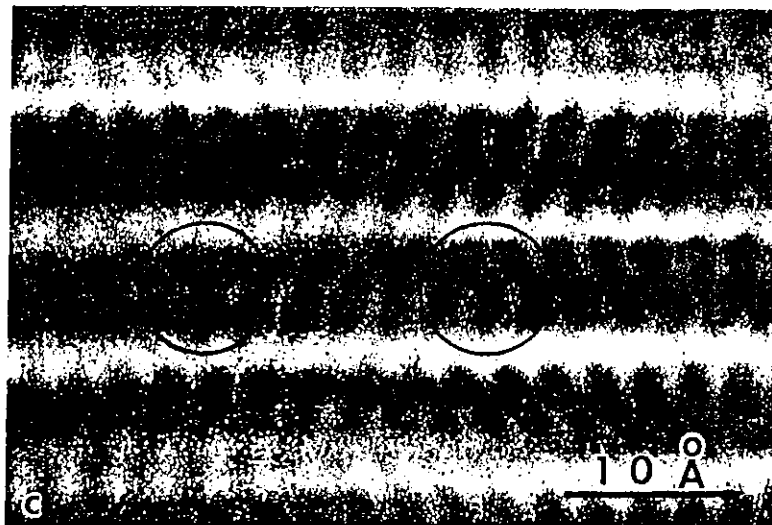


図 22 (a) Electron micrograph of chrysotile fibers; (b) Optical diffraction pattern of the encircled area in (a); (c) Optically processed image of the same area as (b), but shown with a right-angle rotation. The lower layer is on the core side of the fiber. (Jeffrey mine, Asbestos, Quebec.)

2. セピオライト (sepiolite)

2-1. セピオライトの構造

石綿 (asbestos) 以外にも繊維状鉱物が幾つか存在する。セピオライト (sepiolite、海泡石) もその一つである。(このセピオライト族には、同じく繊維状のパリゴルスカイト (paligorskite) も属している)。セピオライトの組成は、 $Mg_8(h_2O)_4[Si_6O_{15}](OH)_4 \cdot 8H_2O$ である。

セピオライトには α 型と β 型の 2 種類があることが報告されている。前者は結晶性がよく、後者は悪いことが XRD (x-ray diffraction) パターンのピーク幅の広がりから、図 23 に示すように、知られていて、格子欠陥説 [13,14] と混合層モデル説 [15] が提案されたが、その原因は明確でなかった。これを確かめるため、これら試料を樹脂で包埋し、ミクロトームで超薄切片にしてその断面を観察した。図 24 は α 型の中国産 (a) と β 型のトルコ産 (b) のセピオライトの断面を比較したもので、 α 型は太くあまり欠陥がないのに対し、 β 型は非常に細く (100 Å くらいの太さ) しかも内部あるいは表面に欠陥が多く含まれていることがわかる。この 2 つの要因から、 β -セピオライトの XRD のピークは幅が広くなり、ピーク位置が低角度側に動くものと考えられる。

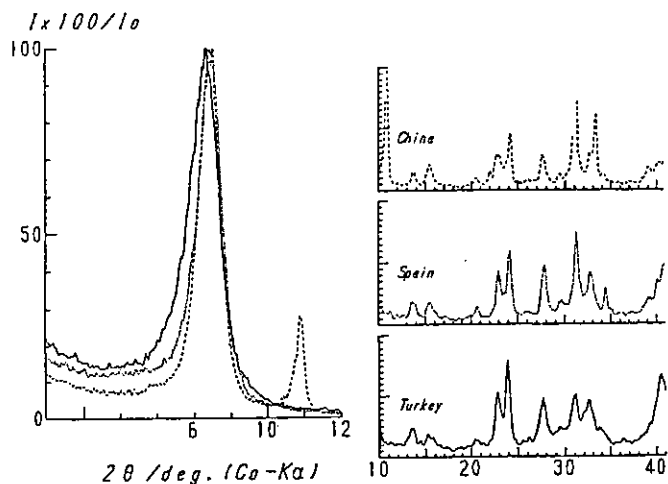


図 23 1 XRD patterns for α -sepiolite (China and Spain) and β -sepiolite (Turkey)

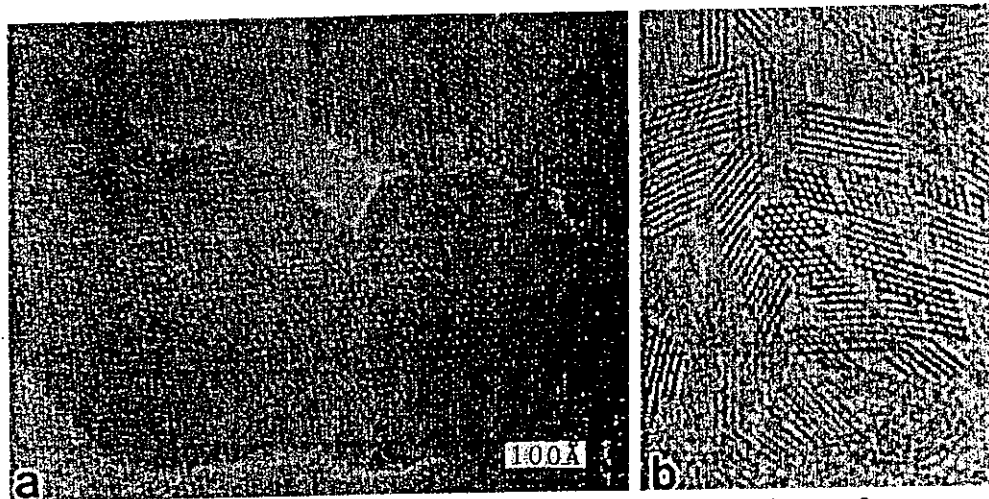


図 24 Typical TEM images of cross section of α -sepiolite (a) and β -sepiolite (b)

3. 繊維状鉱物の生体に及ぼす効果

3-1. 珪肺 (silicosis) と石綿肺 (asbestosis)

珪肺は、無機粉塵を吸入した結果起こる肺胞間質の繊維かなどの肺病変の総称で、石英などの結晶性珪酸を始め、珪酸塩鉱物、粘土鉱物、酸化物など種類によって程度の差はあるが統べての無機粉塵によって起きる。それらの原因物質の名前で珪肺、石綿肺、タルク肺、アルミナ肺等と呼ばれる。

石綿肺は、第2次世界大戦後、先進工業国で石綿の生産と消費が急激に伸びたのに伴い、石綿鉱山や石綿工場労働者に癌が多発し、さらに、1960年頃から、それまで希な病気であった悪性中皮腫 (mesothelioma) も発見され始めた。最近10数年の研究によって石綿の発癌性は完全に立証され、その立証に分析電子顕微鏡は大きな貢献をした。

1910年代に石綿工場で働いていた女子労働者の肺組織中に奇妙な形をした「異物」が光学顕微鏡で見つかり、このような「異物」は石綿肺患者の肺組織中に広く存在することから「石綿小体」(asbestos body) と呼ぶようになった。石綿暴露と肺癌発症の因果関係を証明した調査は、Doll [16] が最初で、彼は英国の石綿紡織工場に20年以上働いた男子113人の中に11人の肺癌死亡者を認め、それが同年令の一般男子の肺癌死亡率の13.8倍高いと報告した。一般に、石綿症の発症は20年以上かかって現れる特徴がある。また、喫煙の影響が大きく、喫煙と石綿暴露が重なると肺癌の発症率は相乗的に増加する。たばこも石綿も吸ってない人の肺癌死亡率を1とすると、石綿暴露を受けた人は5.2倍、たばこを吸う人は10.9倍であった。

3-2. 石綿関連疾患と分析電顕

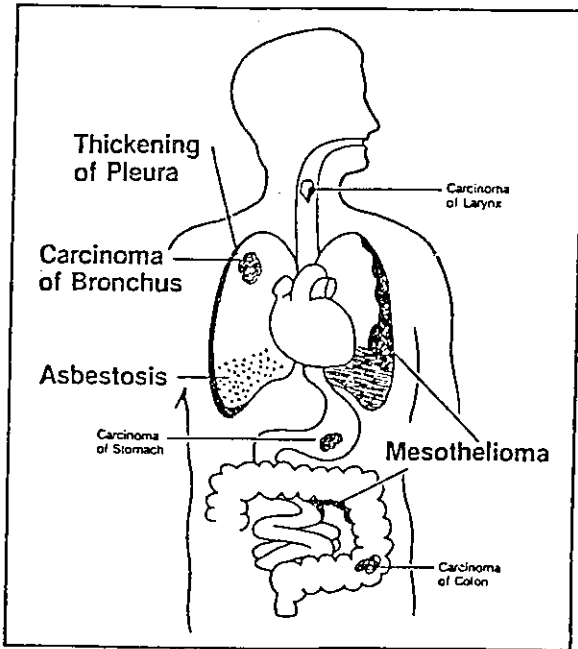
図25は石綿暴露によって如何なる疾患ができるかを示す。図26は石綿症患者の厚さ4 μ mの肺組織中の石綿小体を透過電顕と走査電顕で観たものである。図27は現在の分析電顕によって組織内の1本1本の石綿を同定できることを示す。

図28は米国及び日本での石綿の消費量の推移をしめす。米国では1972年頃から厳しく使用を規制したが、日本は遅れ最近になってやっと自主規制をするようになった。図29は使用を規制した米国で今後石綿による肺癌の職種別の死亡数の予測を示したもので、1995年頃をピークに減少するが影響は2030年頃まで残ることが判る。

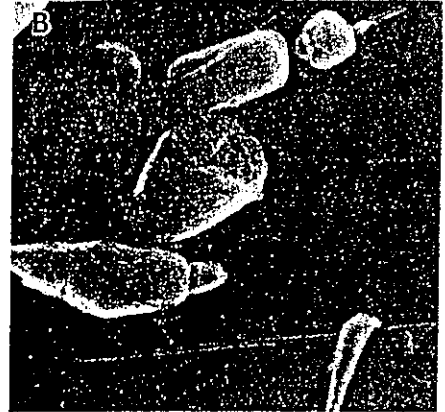
旧ソ連でも相当量の石綿が生産され使用されていたと推測されるが、現在如何なる状況になっているか我々には不明である。

3-3. 石綿代替品の問題

石綿の健康障害への対策の一つとして、石綿に代わる繊維状材料の開発と使用が盛んに研究されてきている。米国のStantonら [17] は、石綿の発癌因子としてその繊維形状が重要であるという仮設のもとに石綿及び石綿以外の無機繊維の様々なサイズの試料を準備し、発癌性の実験的研究を進め、生体内で安定な細くて長い繊維状物質であれば化学組織や結晶構造に関係なく中皮腫を発生させることを発見した。特に直径が0.25 μ m以下で長さ8 μ m以上のサイズの繊維が最も発生率が高いことを見いだした。同じ頃、西ドイツのPott [18] も図30に示すような同様な成果を報告し、広く世界の注目するところとなった。

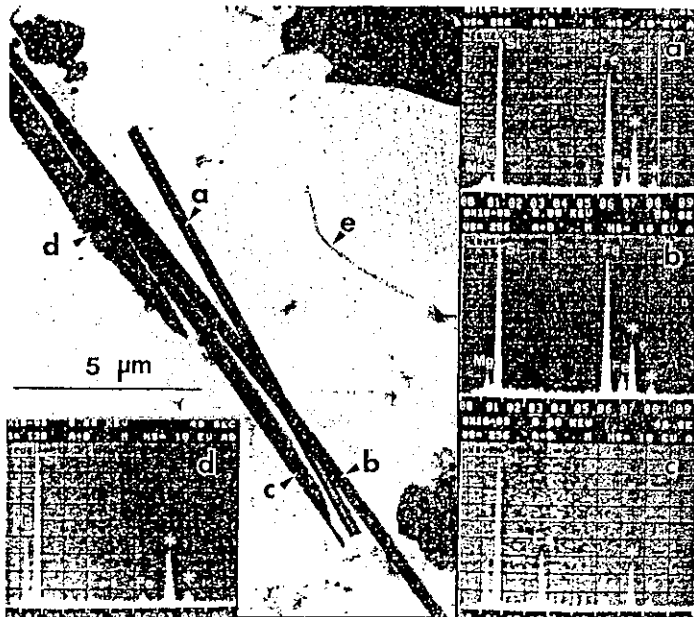


SOURCE: Illustration by Mr. Jerry Farrell, Audio-Visual Centre, McMaster University; consultative assistance by Dr. David C.F. Muir, Director, Occupational Health Program, Health Sciences Centre, McMaster University, Hamilton, Ontario.

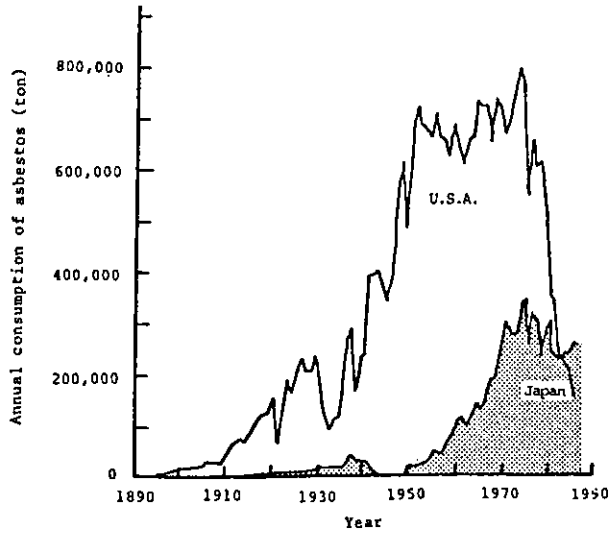


☒ 2 5 Asbestos-related diseases and their sites in the human body.

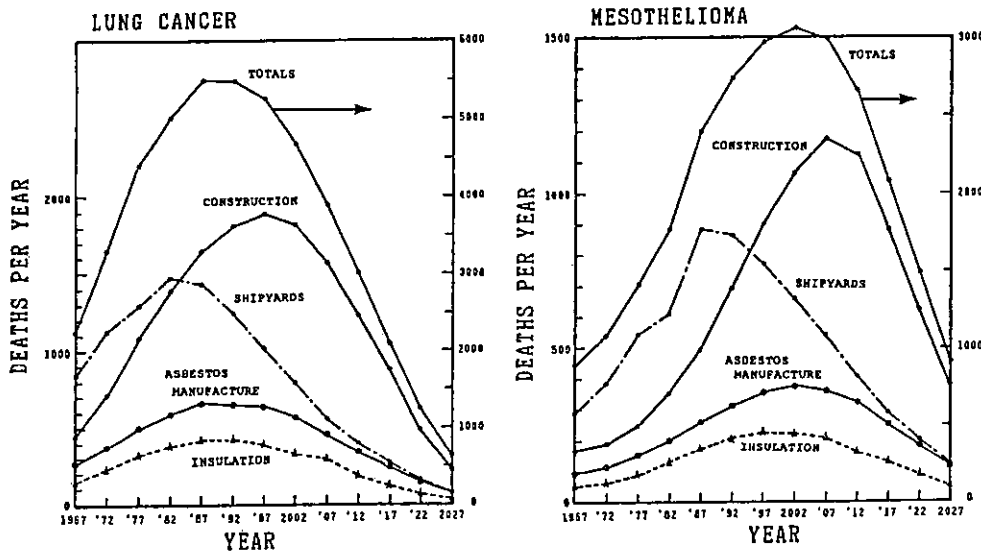
☒ 2 6 Crocidolite fibers and the asbestos bodies found in the TBLB specimen taken from an asbestos worker diagnosed as asbestosis. (Male, 49 yrs, worked in an asbestos factory and a railway company for 25 years, PS-12 A, Case 5).



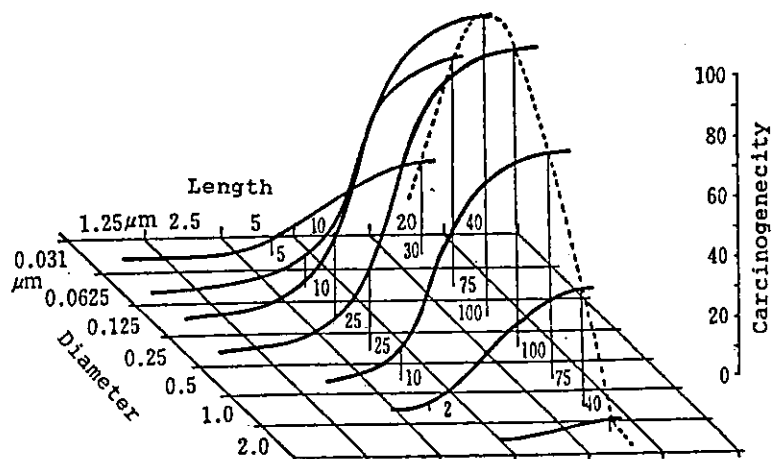
☒ 2 7 Four kinds of asbestos fibers and a talc fiber identified by analytical electron microscopy in the TBLB specimen. (The same case of Fig. 3, a: crocidolite, b: amosite, c: tremolite, d: talc e: chrysotile).



☒ 2 8 Annual consumption of asbestos in U.S.A. and Japan.



☒ 2 9 Excess deaths of lung cancer and mesothelioma due to occupational asbestos exposure, 1967-2027 in U.S.A. (Data from Nicholson, et al., 1982¹⁰).



☒ 3 0 Carcinogenicity of fibrous minerals by Pott (1980)²³. His animal experiments revealed that thin and long fibers being stable in the body showed high carcinogenicity in spite of the crystal structure and chemical composition.

文献

- [1] J. W. Menter: Proc. Roy. Soc., A236 (1956) 119.
- [2] K. Yada and T. Hibi: J. Electronmicrosc. 18 (1969) 226.
- [3] D. Willasch: Proc. EMAG75 meeting (Bristol) (1975).
- [4] E. J. W. Whittaker and J. Zussman: Min. Mag., 31 (1956) 107.
- [5] L. Bragg and G. F. Claringbull: *Crystal Structure of Minerals*, G. Bell and Sons Ltd., London (1965).
- [6] K. Yada: Acta Cryst., 23 (1967) 704.
- [7] K. Yada: Acta Cryst., A27 (1971) 659.
- [8] H. Yagodzinski und G. Kunze: N. Jahrb. Mineral. Monatsh., 7 (1954) 137.
- [9] K. Yada and K. Iishi: J. Crystal Growth, 24/25 (1974) 627.
- [10] T. F. Bates and J. J. Comer: Clay and Clay Minerals, Proc. Sixth Natl Clay Conf., 1957, p. 237.
- [11] K. Yada and T. Tanji: Proc. 4th Int. Conf. Asbestos, Torino., (1980) 335.
- [12] T. Tanji et al: Clays and Clay Min., 32 (1984) 429.
- [13] M. Rautureau and C. Tchoubar: Clay and Clay Minerals 24 43 (1976).
- [14] A. Alvareyz et al: Proc. Inter. Clay Conf., Denver 1985 ed. H. van Olphen and F. A. Mumpton. (1987) 370-374.
- [15] G. W. Brindley, Chap. 2 in "Crystal Structure of Clay Minerals and X-ray Identification" ed. by Brindley and Brown, Mineralogical Soc. London (1984) pp. 186-189.
- [16] R. Doll: Br. J. Industr. Med., 12, (1955) 81.
- [17] M. F. Stanton et al: J. Natl. Cancer Inst., 67 (1981) 965.
- [18] F. Pott et al: Biological effects of mineral fibers. IARC Scientific Publication No. 30, Vol. 1, (1980) 423-432.

Influence of particles on Cell function and Proliferation

Kazuchika Tamura, Noriyuki Takashi, Haruhiko Kashiwazaki, Yasunori Totsuka

緒言

ナノサイエンスは医療分野においても新たなバイオマテリアルの開発を期待されている。事実、ドラッグデリバリーシステム、遺伝子ベクター、組織再生の足場といったいろいろな研究が進められており、中でもカーボンナノチューブやフラーレンといった炭素新物質の性質はその応用範囲が広いと考えられている。だが、そのようなナノサイズの粒子の生体への影響については、まだ十分な検討がなされていない。生体分布や体内動態、あるいは炎症反応や免疫システムへの影響などといった毒性の面でも、まだ人体に適用できるほどの知見はない。ナノサイズの異物に対する反応を検討する必要があると思われる。

一方ではすでにナノ・マイクロ物質・材料群がこれまでにない新しい機能を持つことから、ナノテクノロジーの発展とともにエレクトロニクス・環境・医療・情報通信・日用品など、様々な分野に応用されている。ナノテクノロジーの発展とともに大気環境中にはナノ粒子が放出され、実際にナノ粒子はいろいろな場所に検出されている。その結果、ナノ粒子は人体に進入する機会が増加する傾向が予想される。しかしながら、ナノ微粒子の特殊な物理学的性状が生体へどう影響するかについては未解明な部分が多い。ナノ粒子は非常に小さいことから、同質量の場合、表面積が非常に大きいことや、表面に吸着する化学物質の量が増加すること、表面の物性が変わってくることから生体への影響が大きな粒子よりも強い可能性が想像される。また、非常に小さいことから、細胞の中や、細胞間隙を通過しやすくなり血中への移行が可能になる。このことは血流を介して暴露部位以外の臓器にも影響を及ぼす可能性があることを意味する。

ナノ・マイクロレベルの粒子は体内動態や生体の反応が従来までのマイクロレベルの粒子とは異なるのは我々も指摘してきた。近年、こうしたナノレベルの粒子に対する生体への影響が注目されている。ナノテクは、環境を改善するのと反対に、環境を汚染する恐れがある。例えば、ナノメートルスケールの微粒子やナノカーボンなどは、環境のみならず人体(体内環境)に悪影響を与える可能性があるのではないかと環境や医療分野の専門家は心配している。私はナノテクの環境や人体への影響について積極的に調べる必要があると考えている。今後も幅広い分野でナノ物質・材料が使われることが予想されるとき、ナノ粒子が持つ特異な機能の発見や応用研究と同時に環境や健康に与える影響についても基盤情報としてデータを蓄積、公開していく必要がある本研究報告ではナノ粒子やその他微粒子の健康影響研究の現状について報告する。

我々はチタン粒子の解析から研究を開始した。チタンは金属中、最も生体親和性に富むとされ、多くの生体材料に使用されている。欠点としてヤング率が低い、耐摩耗性に劣ることが挙げられる。人工関節等の医用インプラントにおいても、純チタン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。我々の研究ではマクロなインプラントの生体親和性に対し、ミクロな微粒子は為害性を示す事を細胞の反応から明らかにした。摩耗粉の生体為害性の発現には様々な要因があると考えられる。バイオマテリアルのナノ・マイクロ微粒子の組織障害作用に影響する粒径効果を検討し、微粒子の為害性発現の機序を解明することを目的とした。対象としてチタン、二酸化チタン、ポリ乳酸、カーボンナノチューブの生体への影響を *in vivo* で検索し、また微粒子の大きさが細胞に与える影響を *in vitro* で調べた。チタンも生体に対する作用機序が一樣ではなく、サイズ依存性があることを示唆している。こうした微粒子のサイズ依存性を追求する手段として、サイトカイン検出など細胞機能性試験 (*in vitro*) による材料の為害性発現のプロセスの解析と動物埋入実験 (*in vivo*) を平行して進めた。その結果を比較しながら

ら、為害性の具体的な中身を生化学的手法で解析を行ってきた。

まず、in vitro での微粒子の生体への影響について微粒子のサイズ効果を動物実験で評価した。動物実験の結果は 100 μm 以上の粒子では生体親和性のあるチタンでも、粒径が細胞より小さくなると長期的に強い炎症反応を示した。これは微粒子が物理的、機械的に炎症性細胞を刺激した結果、細胞死や、活性酸素の産生、細胞間伝達物質の放出が起きるためであると考えた。

そこで、in vitro で細胞機能試験を行ったところ、粒径が2 μm 以下では、食食反応を起こしており、また細胞死(LDH 活性)・活性酸素の産生・サイトカインの産生が有意に高くなった。ここから、微粒子に対する生体の反応として、炎症性細胞による食食が問題になることが示唆された。さらに、粒径が小さい二酸化チタンや今回利用することになる CNT を用いて試験的に実験した。

将来的には微粒子の生体内の動態を把握し、体内に導入し機能性コントロールインプラントのようなバイオマテリアルの開発や特定の臓器に薬剤を運ぶ DDS、安全なベクターとしての遺伝子導入、再生医療への応用を検討したい。

材料

平均粒径の異なるチタン(0.5 μm , 2.3 μm , 13 μm , 53 μm , 156 μm)、二酸化チタン (32nm, 510nm, 2 μm)、ポリ乳酸 (1.5 μm , 13.6 μm)とカーボンナノチューブ(ϕ 15/250nm)を指標として用いた。このように平均粒径をそろえ、サイズによる影響・反応の違いを調べた。

次に様々なナノ・マイクロ微粒子として、金属はチタン、鉄、ニッケル、金、銀、白金、パラジウム、コバルトなどとそれらの酸化物を対象とし、ポリマーとしてはポリ乳酸、ポリメタクリレートやポリエチレンなどの微粒子を作製し実験に用いた。粒子は粒子数を調整した後、生理食塩水中に分散させた。コントロールとして各粒子を培地中に入れ、1週間インキュベーター内に置いた後、ICP でイオン溶出量を測定した。

カーボンナノチューブ(CNT),カーボンナノファイバー(CNF)とカーボンナノカプセル(CNC)は多層カーボンナノチューブ(CNT):NanoLab 社製、純度 80%の製品を東北大学大学院工学研究科田路研究室で加工したものを用いた。これらは田路研究室独特の方法を用い、切断、精製して大きさを統一した。これらをサンプルに生体に対しての微粒子サイズの影響や各材料の微粒子の影響を実験した。

ラット

in vivo の実験には 8~10 週齢雄性ウイスター系ラットを用いた。平均体重は 302g で搬入されてから1ヶ月たった健康なラットのみを用いた。

細胞

ヒト歯根膜由来線維芽細胞

実験に先立ち、北海道大学歯学部倫理委員会に承認を受けた。歯学部附属病院において、矯正治療に伴う便宜抜歯を受ける 14 才から 22 才の患者と家族の同意を得て、抜去された第1小臼歯の歯根膜細胞を採取した。歯根膜細胞は PSN1%,FBS10%添加 α -MEM を用い、37°C5%CO₂ の条件で培養した。実験には対数増殖期の細胞を 3000cells/100 μl に調整して用いた。

ヒト好中球・単球

ヒト好中球・単球は健常ヒトから採血したあと、通法に従い、6%ヒドロキシエチルデンブレン加生食水と Ficoll-hypaque を用い分離し、生理食塩水で洗浄し用いた。その好中球に各微粒子の試料を混和し、37°Cで30分間インキュベートしたものを検体とした。実験には細胞を 10^6 cells/ μ lに調整して用いた。

ラット腹腔・肺胞マクロファージ・線維芽細胞

6週齢雄性ウイスター系ラットの腹腔内に10ccの1%ホルボールミスチン酸アセテート生理食塩水を注入しマクロファージを浸出させたあと、開腹し生理食塩水ごとマクロファージを集め、他血液成分を除去したのちPSN1%,FBS無添加 α -MEMを用い、37°C5%CO₂の条件で培養した。

肺胞マクロファージはラットの気管切開を行い7ccの生理食塩水を肺に送り込み何回か表面を洗い流して全量回収して分離調整した。

腹膜からは線維芽細胞を採取し培養した。

方法

in vivoの実験では、ラットの皮下に埋入した各微粒子を、周囲軟組織を含めて摘出し、病理組織学的に検索した。Pentobarbital Sodiumの腹腔内注射による全身麻酔を行った8~10週齢雄性ウイスター系ラットの腹部に切開を加え皮下にポケットを形成し、試料を埋入、縫合した。埋入後、試料については1および4週後にPentobarbital Sodiumによる全身麻酔後、灌流固定を行い周囲組織とともに摘出し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて観察した。長期症例としては1年および1年6ヶ月後に周囲組織とともに摘出し、浸漬固定を行い、光学顕微鏡にて観察した。

in vitroの実験には、ラットマクロファージ、ヒト好中球およびヒト歯根膜由来線維芽細胞に各金属微粒子の試料を混和し、生存率、増殖率と活性酸素産生量、サイトカイン(TNF- α ,IL-1 β ,IL-8,GM-CSF等)、PGE2等産生量を計測した。以下に手法を示す。

細胞機能試験

①細胞生存率

1. 粒径の歯根膜細胞増殖率への影響

各粒子の試料の総表面積を 2.5×10^2 mm²となるように調整した。試料混和24時間後、PBSで洗浄し、 α -MEMとCell counting Kit(同仁化学研究所)を加え、インキュベーターで3時間反応させた。発色後、マイクロプレートリーダーを用い測定波長405nmで吸光度を測定し、細胞数を計算した。

2. 粒径と粒子濃度の歯根膜細胞増殖への影響

細胞増殖への影響を調べるために、0.5,3,10 μ mの各チタン試料の粒子数と細胞数が1:100,1:10,1:1となるよう調整し散布した。1,3,6,12,24,36,48時間後にCell counting Kitを用い、1と同様の方法で細胞数を測定し、増殖率を比較した。

3. 細胞生存率の算定

各検体をトリパンブルーで染色し、色素排除法にて光学顕微鏡下で好中球・マクロファージの生細胞数をカウントした。

4. 乳酸脱水素酵素(LDH)活性値の測定

各検体を乳酸基質・ジアホラーゼ法にてLDH活性値を測定した。