

200400206B

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14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成17(2005)年3月

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14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総合研究報告

I.1 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…… 1
亙理 文夫

(研究協力者報告)

- a. カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用……43
赤坂 司
- b. カーボンナノチューブならびにカーボンナノロッドによる……70
マクロファージならびにマウス脾臓細胞の活性化
柴田 健一郎
- c. カーボンナノチューブ・ファイバーの細胞培養系における細胞増殖活性……80
ならびアルカリフォスファターゼに及ぼす影響
田村 正人
- d. リポソームのカーボンナノチューブ組み込みに関する基礎的研究……91
鈴木 邦明
- e. カーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウムコンポジットコロイド:……99
特性および生体適合性の研究とバイオテクノロジー応用
古月 文志
- f. X-線を用いたナノクラスターキャラクタリゼーション手法の開発研究…… 103
朝倉 清高
- g. カーボンナノチューブの細胞に対する影響…… 114
一細胞増殖と抗酸化機能に関して一
柴 肇一
- h. カーボンナノチューブの複合材料への応用、カーボンナノカプセルの…… 127
生体為害性評価及び生体内ナノ微粒子の状態分析に関する研究
宇尾 基弘

I.2 分担研究報告

1. 生体医療応用を目指したカーボンナノチューブ・ナノファイバーの…… 135
合成・高純度精製・水溶化・サイズ制御、およびハイパーサーミア
(温熱療法)への医療応用を目指した磁性ナノ微粒子の合成・サイ
ズ分級に関する研究
田路 和幸

2. ナノ微粒子の生成・物性および生体に与える電磁気的影響…………… 179
羽田 紘一
3. 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…………… 206
バイオ応用に関する研究
戸塚 靖則
4. 多層カーボンナノチューブから生体材料の合成に関する研究…………… 234
大森 守
5. カーボンナノチューブ(CNT)固化体の作製と機械的特性評価ならびに……………263
CNTとTiのHApコーティングに関する研究
橋田 俊之
6. ナノ物質の生体材料への応用に関する研究…………… 302
*in vivo*および*in vitro*でのナノ物質の反応
横山 敦郎
7. 医療用アクチュエーター利用を目的とした親水高分子の高機能化と…………… 354
制御性に関する研究
野方 文雄

II. 研究成果の刊行に関する一覧表……………373

III. 研究成果の刊行物・別刷

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)

総合研究報告書

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

「ナノテクノロジーは新しい機能性を生み出すとともに、新たな毒性の発生源ともなるのか？」というナノトキシコロジー問題が最近指摘され始めた。生体親和性に富むチタンのようなバイオマテリアルでも、微小サイズの粒子になると組織刺激性を示すようになる。材料のナノサイジングは新たな機能性を産み出しナノテクノロジーの展開が図られているが、一方でナノパーティクルは人体が生体防御機構の対象として想定してこなかった新たな異物であり、組織傷害性もまた昂進する可能性がある。ニッケル微粒子による腫瘍発生などナノ/マイクロ微粒子になると為害性も著しく昂進し典型的なナノトキシコロジー効果を発現する。

微粒子のバイオ応用を図るにはマイクロ/ナノ化により特異的に発現する組織反応性をまず明らかにする必要がある。ヒト好中球、歯根膜細胞、マクロファージ、ゾウリムシほかの各種細胞を用いた機能性試験により細胞生存率、増殖率、LDH、活性酸素、サイトカイン TNF- α , IL-1 β , IL-8, M-CSF 産生を調べ、埋入試験により組織反応の病理学的検索を行った。マクロサイズで生体親和性(bioactive, bioinert)を示すバイオマテリアルでも 100 μ m 以下粒子径が小さくなるほど刺激性は増大し、貪食を誘発する 3 μ m ~ 500nm では最も顕著になりサイトカイン・活性酸素産生等の細胞傷害性、血管拡張・細胞浸潤等の周囲組織への強い炎症を示した。さらに小さな 500nm ~ 50nm になると刺激性はやや低下する傾向を示した。針状粒子は塊状に比べ貪食の有無によらずより強い刺激性を示した。

このような効果はチタン、鉄の金属、二酸化チタン、磁性微粒子の酸化物、ポリ乳酸の高分子のいずれの材料にも見いだされ、物質によらない効果であると考えられる。そのメカニズムは微粒子と細胞・組織とのサイズの相対的な関係に由来する効果である。微粒子サイズ効果による為害性の程度は細胞内毒素の 1/1000 以下と低い、組織内では貪食を誘発し金属の場合には細胞死を導いて局所に残留し長期炎症を継続する点で注意が必要である。また 30nm の二酸化チタンの強制露曝試験を行うと肺胞を通してナノ微粒子が体内に取込まれた。微粒子サイズが 50nm ではマクロファージ等が異物と認識・処理できず、リンパ液や血液に取込まれ全身に拡散し他臓器に影響を及ぼす可能性もある。こうしたナノトキシコ

ロジ問題に対し *in vitro*, *in vivo* の生体反応素過程・局所組織レベルのみでなく今後、呼吸・消化器系も含めた全身動態レベルでの挙動を把握する必要がある。

最も代表的なナノパーティクルであるカーボンナノチューブ(CNT)については *bioinert* 材料一般に起きる程度の微粒子刺激性は有するものの、短中期的には発癌性など特異的な生体為害性は認めず、むしろバイオ応用に有利な、細胞・組織に対する特徴的な種々の特性を多数見出した。

バイオ用として精製高純度化、可溶化、サイズ調整した CNT、および物理・化学的処理性の高いカーボンナノファイバー(CNF)を作製した。CNT 派生体群中で、m-RNA の発現、軟組織内の炎症の程度、細胞ライソゾーム内での分解性とも CNF のほうが CNT よりも生体による処理性が高く結晶構造依存性を示した。

バイオ応用として、過飽和度を適度に有する擬似体液への浸漬によるアパタイトのバイオミメティック・コーティング、すぐれた細胞付着性・伸展性を示す細胞増殖用スカフォールド、殺菌等の化学的・薬理的効果によらず物理的吸着により菌数を低減する細菌吸着効果、コラーゲンとの相互作用による歯質の選択吸着を利用したコンポジットレジン/歯質 接着界面マーカー、親水性と分散性に富む CNT ソル内包アルギン酸ビーズによる環境浄化用選択吸着剤および経口投与試験、リポソームへの CNT 組み込み、糖鎖・タンパク質による表面修飾、リガンド・レセプターの特異的結合を利用した遺伝子導入用担体、カーボンナノカプセルの精製・血管内投与、CNT 複合材料の試作を行った。

放電プラズマ焼結で作製した多層および単層 CNT 固化体は骨に類似した物性を有し、セラミックスとして特異な擬似塑性変形と高い破壊靱性を示した。また固化 CNT とチタン表面に水熱合成によりアパタイト膜のコーティングを行った。乾式高温合成によるナノアパタイト/CNT、湿式によるナノ炭酸化アパタイト/コラーゲン、厚さ方向にナノ炭酸化アパタイト+コラーゲン/ポリ乳酸の組成を変化させた傾斜機能型 GTR 膜の各ナノコンポジットの開発を行った。

放射光による蛍光 XAFS 法から触媒が Ni の CNT では強酸処理後もグラフェンシート中にダイマーとして残留し、チタンインプラント周囲組織の極微量検出 Ti は金属と酸化物の両ケースがあることを見出し光電子顕微鏡開発を行った。

金属系および酸化物系磁性ナノ微粒子を合成し、磁性ナノ微粒子の表面磁気異方性のシミュレーション、センチネルリンパ節検出法としての医療応用モデル試験、癌の温熱療法に最適なマグネタイト粒子のサイズ分級を行った。

ナノ構造制御した膜状電解質高分子膜にドーライト塗布、PMMA 被覆、脱水処理を施し、耐久性、弾性率、発生力の向上、応力緩和の抑制、屈曲制御性の改善を達成し、医療用アクチュエータ、マイクロポンプを試作した。

以上、本研究はナノ/マイクロ微粒子の物理的サイズ・形状効果による生体為害作用が微粒子の体内分布・動態、炎症や免疫システムへの影響などの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であること、CNT はバイオ応用上、種々の特徴を有し、いまだ萌芽的段階にあるが将来の発展性は大きいことを明らかにした。

分担研究者		
大森 守	東北大学金属材料研究所 附属新素材設計開発施設	助教授
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 附属エネルギー安全科学 国際センター	教授
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
横山 敦郎(川崎貴生を継承)	北海道大学医学部歯学部附属病院	講師
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反応

A 1. 生体反応性に及ぼす材料のサイズ効果

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。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。

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。

A 2. 微粒子と生体反応

(1) ナノテクノロジーとナノトキシコロジー

ナノパーティクルの代表的な応用例として現在ドラッグデリバリーシステム(DDS: Drug Delivery System)の開発が産学官で進められているが、これは意図的に血液中に回流させ癌組織等の標的患部に抗癌剤をはじめとする薬剤を選択的に投与しようとするものであり、ナノテクノロジーならではのメリットである。一方で例えば、ある種の化粧品には色調調整や紫外線カットのために30nm大の二酸化チタン粒子が含まれている。このレベルの大きさの微粒子は呼気によって肺胞に到達し血液中に溶解して全身を回流し、大きさによって腎臓、肝臓等のフィルター機能にトラップされて濃縮排泄される、あるいはフィルターを通過して脳や心臓など他臓器に到達蓄積することが可能性としてあり得る。これは意図せずして血中を回流する効果であり、ナノパーティクルにして初めて起きてくる現象としてナノトキシコロジーと呼ぶに相当するデメリットである。

さらにナノアパタイトでは炎症は誘発するが、結果として処理吸収されるとともに骨形成を促し、骨置換性の新しい機能が発現する。

ナノテクノロジー開発にあたっては必然的にその新しい機能性というメリットを強調して進められるのが普通である。しかし一般に材料のミクロ/ナノサイズ化にしたがって化学反応は活発になるから、その為害性、毒性の効果もまた著しくなることは十分に予想されるところである。我々はナノテクノロジー開発のいずれかの時点で、さらなる展開を適切に図るために、ナノ/マイクロ微粒子の生体ならびに環境に及ぼすナノトキシコロジー/安全性条件を見極める必要がある。

(2) ナノトキシコロジー

生体親和性に優れたバイオマテリアルも、人工股関節部のように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。

50nm以下のナノ粒子は肺の細胞をすり抜けて血液やリンパ系に入り込む可能性がある。報告によればナノ微粒子を注入後のラットでは高い確率で肺がんが発症したり、肺組織やリンパ節には3~6割多い粒子が侵入・沈着する。

ナノパーティクルは人体が生体防御機構の対

象として想定してこなかった新たな異物である。従来の生体防御機構にはかからずに体内に侵入し、影響を及ぼす可能性があり、全身環境中での微粒子の動態は複雑になる可能性があり、未知の部分も多い。

(3)生体適合性の微粒子サイズ依存性

我々はナノトキシコロジーという概念が欧米から提起されてくる以前から、こうした問題を研究対象に、バイオマテリアルの生体適合性の生化学的手法に基づく評価法の確立とナノ/マイクロ微粒子に対する生体反応性探索、その上に立ったカーボンナノチューブほか微粒子のバイオ応用開発を先行して行ってきた。そして摩耗粉等の微粒子に対する生体反応、作用機序の解明を試み、ナノ/マイクロ微粒子になると、従来知られているマクロな生体反応で支配的な、イオン溶出に基づく化学的効果としての生体為害性とは異なる、物理的なサイズ依存性を有する細胞毒性が顕在化することを報告した。

(4)ナノテクノロジー開発への警鐘

我々の問題意識は摩耗粉の生体為害性から出発したが、既に微粒子は様々な分野で利用されている。歯科材料では印象材、石膏、埋没材、歯科用セメント、床用レジン、アマルガム、研磨材等、長期保管性の便から、組成内容を粉と液に分離して保管し、使用前に混和して硬化体を治療に用いる粉液法が多用されている。同じ材質でもこのときの粉末粒子の形態、サイズ、粒度分布、気孔率等は混和時の操作性、硬化体の物性・耐久性に深く影響する。歯質、歯科補綴物の切削、研削、研磨を含め、歯科医療にたずさわる歯科医師、歯科技工士、歯科衛生士は粉末が関与する環境下で作業することが多い。

またこうした専門領域に限らず、日常生活において化粧品、薬剤、洗剤、ペイントなど一般国民の身近に使われている様々な大衆商品がある。

一方、21世紀の少子高齢社会で若年者層への負担の大きい21世紀日本を支える技術としてIT、バイオ等の分野において新たな機能性を生み出すナノテクノロジーの開発が産学官で大々的に進められており、必然的に材料のマイクロ/ナノ微細化が進展している。

しかしここにきて最近、ナノトキシコロジーとして微細化により毒性もまた顕著になると危険性を指摘する記事が欧米から出されてきた。

例えば、

「ナノテクが新たな有害物質を生む？－最新電子顕微鏡が明かすナノ粒子の素顔－

ナノテクが新たな有害物質を生む？ナノテクノロジーによって生み出された新しい微粒子が人体にもたらす健康リスクについて、懸念が寄せられている。粒子は小さくなるにつれて化学反応性が高まるが、毒性もまた高くなると危惧される ...。」 メールマガジン <<http://www.hotwired.co.jp/news/news/20040115302.html>>

ナノトキシコロジーの問題はナノテクノロジー推進により現れたDDSやカーボンナノチューブ等、現在、開発中で新しい機能性に注目したナノマテリアル、ナノパーティクルの安全性の再検討を迫るものであり、その帰結はカーボンナノチューブ等、日本発の新規機能性材料・技術の重点開発動向の今後を左右する重要課題である。

のみならず、ナノパーティクルは化粧品や薬剤など、従来既に多くの医薬品、健康関連商品に使用されており、国民が日常的に使用する一般大衆商品まで及ぶ点でその影響は特に重大である。

こうした安全性の再検討問題には科学的根拠に基づく対応が求められる。しかしこの点に関し現状では判断に資する具体的な研究はあまり見あたらない。

(5)ナノトキシコロジー問題への対応とバイオ応用開発

ナノテクノロジーやナノマテリアルおよびカーボンナノチューブの危険性の可能性に関する報道の多くは具体的な研究データに基づかないままに議論が進められおり、細胞機能性試験や動物埋入実験による本格的な研究は少ない。

「ナノテクノロジーは新しい機能性を生み出すとともに、新たな毒性の発生源ともなるのか？」－このナノトキシコロジーの問題に回答するためには、①生体に作用する微粒子の2大側面：為害性(ナノトキシコロジー)と高機能性(ナノバイオテクノロジー)の両者を統一的に把握し、②人間の健康への影響について検討した上で、ナノトキシコロジー/安全性条件を提起し、③これら科学的根拠に基づく生体と環境に安全なナノテクノロジー開発指針(案)のもとに、④日本発の代表的ナノマテリアルであるカーボンナノチューブはじめ、ナノパーティクル、ナノ

コンポジットのバイオ応用展開を図ることが必要である。

(6)本研究の位置づけと目的 ①

ーナノ/マイクロ微粒子、カーボンナノチューブの生体反応性：ナノトキシコロジー検索

ナノトキシコロジーの問題はナノマテリアルの開発の意義と将来性について問題を投げかけ、ますます微粒子の生体反応性とバイオ応用の研究の重要性を認識させることとなった。これに基づき本研究は平成14～15年度と同様、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評価法(in vitro)の導入と、in vivo 組織反応性試験を併用し、為害性発現プロセスの解析を行い、生体適合性に及ぼす影響について調べることを第1の目的として研究を行った。

我々は先に微粒子サイズが10 μ m以下になると物理的サイズ効果による刺激性が急激に昂進することを明らかにしたが、平成16年度はこれに加え、新たに生起したナノトキシコロジー問題の評価と判断に関する視点から、さらにサブミクロン以下でどのようになるのか調べた。また塊状、針状微粒子等の形状依存性の影響を調べ、さらに呼吸器系を通してナノ微粒子が体内に取込まれるかどうか、強制露曝試験を行った。

(7) 本研究の位置づけと目的 ①(続)

ーカーボンナノチューブの生体適合性

中でも代表的なナノマテリアルとして、日本で最初に発見されその応用開発が進められているカーボンナノチューブについては、繊維状結晶という肺ガンを引き起こす発ガン性物質としてのアスベストと類似の形態を持つ連想から、同様な毒性と危険性をもつのではないかという指摘がなされている。

我々が既に行った短期的な試験結果の範囲内では、特異的な生体為害性は認められず、むしろ生体材料として有利な生体親和性的性質が多数見出したが、今年度も引続き、中期的生体反応性試験やサブミクロン以下のサイズ依存性、様々なCNT派生体間の差異を検討した。

II. 微粒子のバイオ応用

(8)本研究の位置づけと目的 ②

次に細胞、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、上記の為害性発現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が本研究事業のもう一つの大きな目的であり、微粒子としてはとりわけCNTに注目して細菌吸着剤、組織再生用スcaffolds、遺伝子導入キャリアー等のバイオ応用開発、またナノアパタイトの機能性を取り込んだ、歯周組織再生用傾斜機能型GTR膜等のナノコンポジットの開発を行った。

III. 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する材料の生体適合性に対する生化学的評価方法の導入した。

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併せ行うことにより、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)で調べた。

B. 研究方法

B1. 微粒子の生体適合性試験

Ti, Fe, Ni(各500nm, 3, 10, 50, 150 μ m), TiO₂(30, 60, 300, 500nm, 2 μ m), ポリ乳酸(1, 13 μ m)の各種微粒子およびCNTおよびCNF(30nm～2 μ m)CNF(2 μ m)ほか粒度調整を行った微粒子について、ICP元素分析による溶出試験を行った後、ヒト好中球、歯根膜細胞、マクロファージ、真皮繊維芽細胞、骨芽細胞様細胞、ラット腹腔・肺マクロファージ、筋芽細胞、骨芽細胞様細胞、マウス脾臓細胞、ゾウリムシほかの各種細胞を用い、細胞生存率、増殖率、LDH、活性酸素、サイトカインTNF- α 、IL-1 β 、IL-8、M-CSF産生を調べ、埋入試験により組織反応の病理学的検索を行った。バイオ用

CNTとして加熱焼却・酸処理による精製高純度化、強酸処理による切断・可溶・分散化・サイズ制御を行い、また糖鎖、アルジネート、HAPによる表面修飾を行った。

B2. その他

その他の研究内容に関する実験方法は上記、微粒子の生体適合性試験の詳細も含め、
―― 亘理文夫(主任研究者)：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 平成15年度総括・分担研究報告書「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」(課題番号：H14-ナ-021)、2004 ――
に記載しており、また後出の各分担研究者、研究協力者の報告書にもあるので、それぞれ参照されたい。

(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、ヒト歯根膜由来線維芽細胞を用いた研究は実験に先立ち、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。動物実験は事前に関連法規*に従い、研究計画の妥当性について、動物実験倫理問題検討委員会で審議され、承認された後、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。また可能なものは in vitro の実験に置き換えられるよう努力した。

関連法規*：「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号及び平成11年法律第221号)」及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和55年3月27日総理府告示第6号)」

C. 研究結果

I. 微粒子と生体反応

C1. ナノ/マイクロ微粒子、CNTの生体反応性

(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 μm 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 μm 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) 微粒子サイズ依存性

微粒子のバイオ応用を図るには、材料のマイクロ・ナノサイズ化によって特異的に発現する組織反応性をまず明らかにする必要がある。ヒト好中球、歯根膜細胞、マクロファージ、ゾウリムシほかの各種細胞を用いた機能性試験(in vitro)により細胞生存率、増殖率、LDH、活性酸素、サイトカインTNF- α 、IL-1 β 、IL-8、M-CSF産生を調べ、埋入試験(in vivo)により組織反応の病理学的検索を行った。

Ti, Fe, Ni(各500nm, 3 μm , 10 μm , 50 μm , 150 μm), TiO₂(30nm, 60nm, 300nm, 500nm, 2 μm), ポリ乳酸(1 μm , 13 μm)の各種微粒子およびCNTおよびCNF(30nm~2 μm)に対するヒト好中球、歯根膜細胞、ラットマクロファージを用いた細胞機能性試験(in vitro)では、微粒子径が小さくなるほど細胞生存率が低下し、LDH、活性酸素、サイトカインTNF- α 、IL-1 β 、IL-8、M-CSFの放出は増加した。特に細胞より小さくなる10 μm 以下では貪食を誘発してこれらの傾向は著しく増大し、ナノ領域でも継続した。組織埋入試験(in vivo)でも微粒子サイズが小さくなると炎症性反応が増加し、およそ100 μm 以上のチタン粒子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 μm 以下では刺激性が亢進し、特に10 μm 以下になると貪食作用を誘発し、長期間炎症反応を引き起こすサイズ依存性を示した。この微粒子の物理的サイズ依存性に基づく細胞・組織刺激性、傷害性は3 μm -500nmの微粒子に対して最も強く、500nm以下ではむしろ低下した。

(3) 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 μm から50,10,3,0.5 μm 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。

(4) 微粒子と生体組織反応(in vivo)

種々のTi微粒子に対して動物埋入試験を行うと、150 μ mTi粒子では各粒子が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、インプラントに使われる巨視的サイズの棒状Tiと同様な生体適合性を示した。50 μ m粒子では各粒子が結合組織で周囲を覆われるが、炎症性細胞も現れた。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た。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、やがて粒子群全体をおおうように結合組織が形成され、長期間炎症性反応が継続した。

図4は3 μ mTi微粒子を埋入したラット軟組織の経時的变化を示したもので、1週間後、30週間後の様子である。はじめ分散していた微粒子は埋入期間の経過とともに、次第に凝集してくる傾向を示す。

図5は図4に見られる現象を説明する機構として、Ti微粒子に対する組織反応の一つの可能性を示した模式図である。

微粒子に細胞・組織が接触すると、好中球が誘因され貪食により微粒子の局所的な凝集をもたらした後、細胞死に至る。このときサイトカインを放出して巨食細胞の分化・誘導、誘引を促し、さらに貪食作用とその結果としての微粒子の凝集を継続するとともに、周囲に線維性結

合組織の形成を促す。これらの複合した作用の結果、微粒子群は時間の経過とともに次第に凝集する。

(5) 微粒子形状依存性

大きさ(直径および長軸長さ)が同じ10 μ m、3 μ m、500nmの塊状および針状TiO₂粒子を用い、細胞機能性試験により微粒子形状の影響を調べた。針状微粒子のほうが有意に細胞生存率が低く、細胞破壊の指標であるLDHの漏出量は高くなった。針状粒子に対するTNF- α 産生量は3 μ m以下で急激に増加するサイズ依存性を同様に示した。IL-1 β 産生量は塊状ではTNF- α と同様なサイズ依存性を示したが、針状では貪食が困難な10 μ m大の粒子でも産生量が高く刺激性を示した。

(6) 強制露曝試験

ラットを用いた呼吸器系への強制露曝試験ではナノ粒子は肺胞に達し、Bio-innertな物質でも炎症を惹起し、病理組織像や粒子の追跡から肺胞から血中へのナノ粒子の移行が認められ、呼吸によってそのままリンパ液や血液に取り込まれる可能性が示唆された。

(7) 長期埋入試験

3 μ m～500nmの微粒子の長期in vivo試験では、Tiでは炎症細胞による貪食、細胞内集積を繰返し、やがて線維性結合組織で覆われ粒子群として凝集するが、周囲に取りこぼしがあり、炎症は長期間持続した。

Ni粒子は埋入後すぐに強い反応を惹起し炎症性細胞浸潤を引き起こし、周囲組織は壊死した。イオン溶出がさらに継続するため、壊死層の周囲に強い炎症層も形成され、6ヶ月後には組織に腫瘍の発生を認め遺伝子レベルでの強い傷害が生じた。

Feでは溶出して周囲組織に広範に分布し組織内の分子や生体に沈着した。これらは線維性結合組織で被包化されるが、ナノ粒子やイオンはその障壁を越えて拡散した。Feは溶出しやすいにもかかわらず、短期的にはイオン溶出による影響は小さいが、長期にわたる組織への残留は重篤な傷害をもたらす可能性も考えられる。

最も代表的なナノパーティクルであるCNTについて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。6ヶ月埋入後も、凝集した粒子群間に炎症が継続している部位や被包化して炎症は認めない部

位等あるが、強い為害性は認められず、肉芽腫の発生は見られなかった。bioinert 材料一般に起きる程度の微粒子刺激性は有するものの、物理的なサイズ・形状効果、および組織内で凝集し二次粒子として作用する効果が主であり、範囲は限定的で生体に強い影響を及ぼす所見は観察されず、アスベストに見られるような特異的な生体為害性は短中期的には認められなかった。同一サイズの針状と比較しても炎症性サイトカインの産生レベルは低く傷害性は認めなかった。むしろ生体材料として有利な細胞・組織に対する特徴的な種々の親和性が多数見出された。

II. バイオ用 CNT の開発

C 2. バイオ用 CNT の開発

(1) バイオ用 CNT, CNF の可溶化とサイズ制御

糸まり状の CNT を強酸中で超音波照射して切断後、遠心分離とフィルター分離を併用しナノチューブのサイズ分離を行った。ポアサイズ 1.2、0.8、0.4 μm の PC メンブランフィルターで順次ろ過し、CNT で平均長 670 nm、540 nm、220 nm、CNF で 1.5 μm、800 nm、400 nm の長さを持つナノチューブの分離に成功した。赤外吸収スペクトルで、水酸基が付加したグラフィンとカルボキシル基の親水基ピークが検出され、サイズ調整した可溶性ナノチューブの作製が可能となった。湿式オゾン処理により、ナノチューブ表面にエポキシド結合を導入し、表面改質を行った。オゾン処理の際に、ナノチューブの置換基が減少する傾向が見られたが、これはオゾン酸化による置換基の分解によって起こった現象と考えられ、ナノチューブの表面を綺麗にする効果もあると推測される。

(2) バイオ用 CNF の開発

CNFs の親水化向上のため、濃硫酸と濃硝酸の混液中で CNFs のエッジを酸化し、水酸基、カルボキシル基を付加させることで、水溶性 CNFs を調製した。同時に強酸中の超音波照射を行うことによって CNFs を切断した。切断された CNFs の長さは 2 時間、4 時間、6 時間の超音波処理に対して、1.5 μm、800 nm、400 nm と短くなり、超音波照射時間によって長さ制御が可能になった。

III. CNT の生体適合性

C 3. マクロファージならびにマウス脾臓細胞

の活性化

ヒトマクロファージ系細胞株 THP-1 細胞から、TLR2 遺伝子を RT-PCR 法により pEF6/V5-His TOPO ベクターにクローニングし、NF-κB 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子(pNF-κB luciferase reporter plasmid)とともに human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に遺伝子導入し、可溶化 CNT および CNF 懸濁液ならびに 10 倍希釈液で刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。CNT および CNF は THP-1 細胞を活性化し、TNF-α 産生を誘導したが、そのレベルは微生物由来リポペプチド FSL-1 の 2000 分の 1 以下であり、非常に低く、TLR2 を介しての NF-κB の活性化能は有していなかった。

マウス脾臓細胞を用いた m-RNA の発現検索でも TNF-α の mRNA の発現を誘導する活性を有していたが、その活性は微生物由来リポペプチドならびにリポ多糖体に比べて非常に弱かった。また CNF のほうが CNT よりも TNF-α 産生が低く、刺激性にサイズおよび結晶構造依存性が認められた。

C 4. 細胞増殖活性に及ぼす影響

(1) 筋芽細胞ならびに骨芽細胞培養系における細胞増殖活性に及ぼす影響

マウス筋芽細胞 C2C12 細胞における DNA 合成量ならびに生細胞数は 670nmMWCNT に対しては無添加のコントロールと比べて有意差は認められなかったが、550nm、220nm とサイズが減少するとともに、有意に増加した。しかし、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞においては細胞増殖活性に対する影響は見られなかった。ナノチューブはサイズに依存して細胞の増殖活性に対して影響を与えうること、細胞特異性があることが明らかとなった。

こうした細胞内シグナル伝達機構を活性化し、細胞増殖に影響を及ぼす作用機序の可能性として、微粒子の細胞に対する物理的な刺激性、大きさの小さい不溶性分子を非自己すなわち異物として認識し、細胞内に取り込むエンドソートーシスが挙げられ、物理的な刺激に対する受容機構の細胞特異性が細胞に依存する反応性の違いをもたらした可能性が考えられる。

(2) 細胞増殖活性ならびアルカリフォスファターゼに及ぼす影響

不死化したミニブタ由来歯根膜細胞株 (TesPDL)の増殖に及ぼす CNT, CNF の影響を細胞増殖活性(DNA 合成量)、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性で調べると骨芽細胞様細胞と線維芽細胞様細胞では作用が異なり細胞特異性を示した。

C 5. カーボンナノチューブの細胞に対する影響 —細胞増殖と抗酸化機能に関して—

(1)カーボンナノチューブの細胞に対する影響 —細胞増殖—

ヒト由来真皮繊維芽細胞 HF (p17) は CNT (可溶化 CNT) に対して、培養 7 日目までコントロールと同様の増殖及び生存を示した。CNT による影響は全く観察されず、可溶化 CNT は細胞増殖促進能、障害能のどちらも有していなかった。

(2)カーボンナノチューブの細胞に対する影響 —抗酸化機能に関して—

可溶化 CNT 及び可溶化処理を施していない超音波分散 CNT の両方とも、抗酸化作用は検出されなかった。超音波で分散化した CNT においては逆に活性酸素生成能をもつ可能性も否定できない。

C 6. ナノ微粒子のゾウリムシの生存及び増殖に及ぼす影響

(1)食胞形成能に対する影響

ゾウリムシ細胞内への CNT の取込み量を、細胞口から取込まれた粒子性物質を濃縮し膜で包んだ食胞の形成数で評価し、経時的变化を測定した。CNT も TiO_2 も食胞形成能力は 3 日間までなら阻害されること無く高いレベルにあることがわかった。

(2)分裂停止期 (post-mitotic cell cycle) の細胞に対する影響

分裂停止期の細胞に対して NiO と NiFe_2O_4 の場合には濃度が高くなるほど時間とともに生存率は低下した。希釈シリーズの溶液を作り、各濃度における生存率を調べた結果、生存率 50%濃度は NiO と NiFe_2O_4 ではおよそ $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 付近に認められた。CNT では、最大濃度の $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ でも 3 日間で 100%の生存率を示した。

(3)細胞増殖に対する影響

NiO および NiFe_2O_4 は共に強い増殖阻害効果を示し、濃度増加とともに増殖率 0 程度まで

抑制する。CNT でも増殖阻害効果はあるが、コントロール比 40%付近で安定化し、それ以上の阻害効果は示さなかった。その後、処理した細胞群を CNT を含まない新鮮な培養液に移して増殖能力を調べた結果、どの処理群でもコントロールレベルまで回復した。

(4)キャピラリー培養法とマイクロインジェクション法による分裂停止期・増殖期、若齢・老化細胞に対する影響評価

単細胞個体のゾウリムシでの細胞機能探査法として、 μl サイズの微量試料検定可能な実験系 (キャピラリー培養法) を確立し、貪食による体内摂取ならびにマイクロインジェクションによる CNF の細胞への直接注入を行い、分裂停止期および増殖期細胞ならびに若齢・老化細胞に対する細胞生存率、細胞増殖能を調べた。 NiFe_2O_4 , CoFe_2O_4 では作製時の焼成条件に依存して強い細胞毒性からきわめて弱いものまで変化した。CNF を取り込んだ細胞は細胞死せず、若齢・老化細胞はともに行動や形態に異常は認めなかった。

C 7. CNT の in vivo 組織反応性とその結晶構造依存性

ラット皮下組織に埋入すると肉芽組織に被包されているものの埋入組織に軽微な炎症が観察されるのみで、組織変性、壊死などの強い炎症反応は観察されず、その炎症の程度は $\text{CNT} > \text{CNF}(1200\text{nm}) > \text{CNF}(600\text{nm})$ の順に軽度になり、起炎性にサイズおよび結晶構造依存性が認められた。TEM 観察では多くマクロファージに貪食されライソゾーム内にも認められたが、特に CNF では埋入期間とともにライソゾーム内での断片化と結晶性の低下が進行し、一種の生分解性(biodegradation)が認められた。長さが 100nm オーダーに比べ μm オーダーのほうが、生体による貪食や処理がされにくいこと、結晶学的に断片化されやすい CNF に比べ、分断される可能性の無い CNT のほうが起炎性が高い。CNT の様々な派生体の中でも結晶構造の違いを反映して生分解性や組織反応性(貪食)が異なる可能性が考えられる。

IV. CNT 単体のバイオ応用

バイオ応用に関して多くの興味深い性質が見つけ出された。

C 8. アパタイトのバイオミメティック・コーティング

図6は人工体液中(R-SBF)でCNT表面に析出したアパタイト微結晶のSEM像である。針状または板状ナノHAP微結晶がCNTを基点に放射状に成長している。

擬似体液にTiを浸漬すると表面にリン酸カルシウムが析出することが知られているが、CNTでもCNTをコアとしてアパタイト結晶が放射状に析出し、容易に表面修飾が可能であった。

以下の多層CNT(MWNT)をカルシウムおよびリン酸イオンを含む数種の緩衝液：

- ・擬似唾液/人工体液派生(Revised Simulated Body Fluid: R-SBF)
- ・人工体液/標準(Standard Simulated Body Fluid: SBF)
- ・人工唾液2(商品名 Saliveht/ Artificial saliva)
- ・ハンクス溶液(Hanks' Balanced Salt Solution: HBSS)
- ・生理食塩水(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline: PBS)

および、それらにFを添加した溶液に浸漬すると、過飽和度を適度に有する条件下で、CNTを核としてナノサイズのアパタイトがよく析出することが観察された。

析出量は基材に依存し、グラファイト、活性炭等、他の炭素系基質と比較すると、PBS(+)中では直径30nmのMWNT上で最も大きかった。結晶形状は多くフレーク状であるが、F添加すると結晶性が増し針状になる傾向が認められた。

C 9. CNTの糖鎖修飾

糖鎖機能を付与するため、MWCNTに対して人工糖質高分子を混ぜると、人工糖質高分子はMWCNT表面へ密に吸着し、表面修飾が容易に達成できた。蛍光ラベル化したラクトース側鎖型ポリスチレンを多層カーボンナノチューブ(MWCNT)分散液に加えると、繊維状形態に沿って蛍光が観察され、表面への糖鎖の吸着が確認され、レクチンとも選択的に結合した。糖鎖結合型アルブミンは単独ではレクチンによる選択的な認識は起こらず、BSAを共存させることにより選択的認識を発現した。ポリアクリルアミド型人工糖質高分子、および糖質系界面活性剤ではレクチンによる選択的な認識は起こ

らず、非特異的な吸着をした。

以上の方法は物理吸着が主で操作が簡便な上に適用できるカーボン基質の適用範囲が広いいためバイオ応用研究において様々な場面で有用であると考えられる。

C 10. 細胞増殖用スカフォールド：

ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)膜およびポリカーボネート(PC)膜上に吸引ろ過固定したCNTスカフォールド上に播種した骨芽細胞様細胞(Saos2)は培養後、細胞増殖が促進されるとともに、成長した細胞は通常単一方向に伸張するのに対し、全方向に広く伸展した形態を示し(図7)、細胞末端では突起がCNT叢スカフォールド内部まで伸展、嵌入した。CNTと強固に結合するため、トリプシン処理でも剥離が困難であり、CNTはすぐれた細胞付着性・伸展性を示した。

C 11. 細菌吸着

CNTと混合、静置後、希釈した上清中の全唾液中細菌、S.Mutans, E.Coliをそれぞれ、寒天培地で培養し、コロニー数を計測すると、添加CNT濃度とともに培養上清の透明度が増し、菌数は1/10以下まで減少した。細菌がCNT叢に入り込み、菌体にCNTが絡みつく様子がSEMで観察され、殺菌等の化学的・薬理的効果によらず菌体の物理的吸着により細菌数を低減する効果が認められた。

C 12. コンポジットレジン/歯質 接着界面マーカー：コラーゲンとの相互作用による歯質への選択吸着

図8はヒト歯牙をリン酸でエッチングした後の象牙質で、脱灰により残留したコラーゲン線維が象牙細管内を含め一面に見られ、その上にCNTが吸着している様子が観察される。疎水性のCNTはコラーゲンに吸着しやすい特性を持ち、エッチング処理した歯質のうちで、エナメル質に吸着されず、コラーゲン線維が露出した象牙質にのみ選択的に吸着される。このことを利用し、コンポジットレジン修復時に歯質に塗布し、レジン再削合時の過剰な歯質の削合を回避する肉眼認識用レジン/歯質界面マーカーとして応用した。図9は臼歯窩洞内部にCNTマーカーを塗布しコンポジットレジン修復後、

再削合した時の断面プロファイルを示したものである。CNTのマーカ効果により、過剰な削合深さは最大120 μ m程度で不要な歯質削合はほとんどない。

C 1 3. 遺伝子導入用担体への応用

リガンド・レセプターの特異的結合を利用した遺伝子導入担体として、インターカレーター付加により発現プラスミドのCNTへの結合とペプチド合成を行い、リン酸カルシウム法による遺伝子導入を試みた。またCNFs/Na-ALG複合体にpCMV b-Gal発現プラスミドを結合し、H1299肺ガン細胞株への輸送に応用した。

C 1 4. 親水性CNT/アルジネートコロイド

(1) 環境浄化用CNTゾル内包アルギン酸ビーズ

現在までの汚染物質の処理法の多くは、高濃度の汚染物質を対象としたものであり、低濃度の汚染物質の処理には非効率的である。複雑な環境物質から選択的に汚染物質を捕集し、既存の処理法が適用できる濃度まで濃縮できる新規な材料として、1.2%アルギン酸ナトリウムと100ppm多層CNTからなり、親水性と分散性に富むCNT/アルギン酸ナトリウム混合コロイド(CNT or CNFs/Na-ALG)を作製した。次に吸着サイトであるCNTの固定、コロイドや腐食酸類などのサイズの大きい物質からの吸着サイトの保護、汚染物質が吸着したCNTと処理水との分離の目的のために、このCNTs/Na-ALGコロイドをアルギン酸ゲルで内包したアルギン酸ビーズ(直径400 ~ 600 nm)を作製した。

このアルギン酸塩ネット(膜)を通過して内部に拡散できる物質の中で、CNTはベンゼン環をもつ物質と強い親和性を有するため、分子量1000程度までの芳香族系有害性物質を選択的に吸着・除去し、CNTと結合しない物質、例えば、水や無機電解質などはCNTに保持されずに、ビーズ(吸着剤)を通過する。この選択捕集・除去能力を利用して、環境中の汚染物質の捕集・除去とともに、CNT包摂アルギン酸ゲルは生体親和性が高く、将来的には生体内に侵入・存在する有害物質の除去にも使える可能性も考えられる。

(2) 細胞増殖及び芳香族化合物の吸着への影響

アルギン酸ビーズ内包CNT及び活性炭、コントロール(アルギン酸ビーズのみ)の細胞(Balb

3T3)の増殖への影響をMTS法によりモニターしたところ、コントロールと同様の増殖及び生存を示し、CNTによる影響は全く観察されなかった。また芳香族化合物のマイトマイシンC(MMC)を加えた培養液中に混和後、上清液で細胞(Balb c3T3)培養を行い、MMCの吸着効果を評価したが、3種とも有意差は認められなかった。さらに実験条件を検討する必要がある。(3)アルギン酸ビーズによる経口投与試験

CNFが酸性の胃液中で凝集するのを避け、腸から吸収されるように、CNFs/Na-ALGコロイドを内包したアルギン酸塩球状中空カプセルをラットへの経口投与、体内吸収を介しての血液成分の生化学的試験に応用した。急性毒性症状等は観察されず、為害性は認められなかった。

C 1 5. リポソームへのCNT組み込み

リポソームは生体膜のモデルとして生体膜及び膜タンパク質の機能解明に使用され、ドラッグデリバリーシステムの担体としても注目されている。全身麻酔薬の作用機序を調べるために、スピラベルしたリポソームの電子スピン共鳴(ESR)スペクトルを測定し、生体膜及び膜タンパク質に対する全身麻酔薬の作用を推定する研究を進めてきた。本研究では生体膜へのCNT,CNFの作用を調べるモデルの作成、およびリポソームの物理的、化学的性質の改善を目的に、スピラベル剤を組込後、リポソームの電子スピン共鳴(ESR)スペクトルを測定し物性への影響を評価した。また粒度分布測定装置、あるいは電子顕微鏡によりリポソーム、CNTおよびCNFのサイズ測定と形状観察を行った。ESRスペクトルから計算されるオーダーパラメーターと回転相関時間から推定されるリポソーム小胞膜の流動性には今回の結果では特に変化は見られなかった。

C 1 6. カーボンナノカプセルの精製と血管内投与

カーボンナノカプセル(CNC)は希土類炭化物(CeC_2 など)の周囲をグラフェンシートで覆われた直径20 ~ 30nmの粒子であり、生体内での造影剤やトレーサーなどへの応用が期待される。ナノカプセル精製時のアモルファスカarbon除去のための大気酸化はMWCNTでは500 $^{\circ}$ C程度の高温で行っていたが、CNCでは

400℃以下の低温で行う必要があることが分かった。Ce含有カーボンナノカプセルの為害性が低いことを確認後、血管内投与し、体内循環臓器への濃縮を検知した。

Ce含有カーボンナノカプセル(Ce-CNC)投与後の臓器への蓄積については、血液中でCe濃度が最も高く存在し、一部の臓器(肺、心臓、腎臓)にもやや認められた。またラットの肺胞、腹腔マクロファージ及びTHP-1細胞に対するCe-CNCの細胞刺激性はチタン微粉末と同程度であり、為害性が十分に低いことが示唆された。

C17. 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。

C18. CNT含有複合材料

放電プラズマ焼結(SPS)で作製したTi-CNT複合体ではTiがCNTと反応してTiCを生成し強化に寄与しなかった。光重合により作製したアクリル樹脂-CNT複合材料の場合には曲げ弾性率がやや向上し、強化の可能性が示された。

V. CNT焼結バルク体の作製と特性評価

C19. CNT焼結固化体・コンポジットの作製と特性評価

(1) 作製と機械的特性評価

CNTのバルク体は軽量不活性で機械的性質に優れると期待されるが、難焼結性である。耐熱性にすぐれたMWCNTに対して結合材として最初にフェノール樹脂、また生体適合性の観点からこれに代えて非晶質SiCの先駆体であるポリカルボシラン(PCS)を添加し、放電プラズマ焼結(SPS)法を採用することにより、CNTの焼結固化バルク体の作製が可能となった。3点曲げ試験およびスモールパンチ(SP)試験の機械的特性試験から、密度 1.7g/cm^3 、ヤング率 $3\text{-}10\text{GPa}$ 、ピッカース硬さ H_{70} と骨の物性($1.6\text{-}2.1\text{g/cm}^3$, $7\text{-}30\text{GPa}$, $H_{70}<60$)に近い緻密体であることが確認され、硬組織修復に適当な特性を備えている。MWCNT焼結体の3点曲げ

試験後の破断面をTEM開催すると、引抜き変形を受けた直径約 30nm のMWCNTの末端が観察され、CNTは焼結後もチューブ状構造を保持していることが確認される。また表面には粒状物が観察され、SiCである可能性が示唆される。HvはPCS含有量が高いほど増加した。

同様に単層CNT(SWCNT)についてもPCS添加およびバインダーレス焼結体を作製した。バインダーレス(SWCNT固化体では破壊時、繊維状のCNTの引抜き効果による摩擦力のために、クラックが急激には進展せず、断続的な引抜きと局所的な破断を繰返す結果、セラミックスとしてきわめて特異的な擬似塑性変形と高い破壊靱性を示した。

バインダーレスSWCNT焼結体の縦弾性係数、破壊エネルギーは焼結温度および圧力の増加に伴い、増加する傾向を示したが、 1400°C , 120MPa の条件では破壊エネルギーは低下した。ラマン散乱測定より、部分的に円柱状のバンドル構造からシート状の構造に変化し、SWCNTsの存在比が低下していることが観察され、焼結過程のプラズマの効果、焼結温度および圧力の相乗作用によりSWCNTsに構造変化が生じたことが確認された。

SWCNTsのみをSPS法にて焼結体を作製することで、未精製焼結体では得られなかった非弾性変形を示す固化体の作製が可能となった。

さらに機械的特性の向上を図るために、SWCNTsの構造を大きく損なうことなく、SWCNTs間およびバンドル間に強固な結合を導入することを目的として、PCSを $10\text{mass}\%$ 添加し、ホットプレス(HP)法による固化体の作製を行った。SWCNT-PCS固化体では約 1500°C 、バインダーレスSWCNT固化体では約 1700°C の作製条件にて、骨と類似した弾性率を有する固化体を得られた。SWCNT固化体は数十本で構成されるバンドルがユニットとして引抜け滑り変形で破断した。PCSを結合材としたSWCNTはPCS濃度の増加とともに強度が増加し、破壊は脆性的になった。

(2) 生体適合性

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、バインダーとして、ポリカルボシランを使用した多層CNT固化体ではフェノール使用時に比べ起炎性ははるかに低いが、結合材濃度が高いほど炎症性は増加した。

C 2 0. ハイドロキシアパタイト被覆

CaHPO₄·2H₂O と Ca(OH)₂ の懸濁液を固化カーボンナノチューブの表面に塗布後、SPS で加圧・加熱することによりハイドロキシアパタイト被膜を作ることにより成功した。1000°C、120MPa の加圧下で生成被覆したアパタイト膜は密着性がよく、切断などの加工を施しても剥げ落ちなかった。Ti 板については 600MPa の加圧下、250 °C から 350 °C の範囲で密着性の良い膜を作ることができた。

また熱間等方静水圧プレス (HIP) を擬似的に実現する二重構造カプセル法を開発し、圧力 40MPa、温度 135°C、24h の処理条件でアパタイトコーティング材を作製することができた。これにより 135 °C もの低温で芯材全面わたり HA セラミックスをコーティングすることが可能となった。引抜試験後、き裂が HA/Ti 界面ではなく、HA コーティング中を進展していることが観察され、界面強度は HA コーティング自体と同等ないしそれ以上のせん断強度を有していること、かつ従来の方法では不可避であった熱分解のない HA コーティングが作製できることが示された。

VI. 顕微鏡観察、スペクトル解析

C 2 1. ナノクラスターキャラクタリゼーション手法の開発

放射光を用いた XAFS 法により CNT 生成に用いられた金属触媒の合金クラスター構造解析を行った。動径分布関数解析で得られた Ni 触媒の Ni-Ni 結合距離と配位数はバルク体と同じことから、10nm を越える金属微粒子として存在しており、強酸による Ni 除去処理後も、CNT のグラフェンシート中の欠陥に Ni-Ni ダイマーが強固に結合固定された状態で約 100ppm 残留していることが蛍光 XAFS 法と多重散乱法解析から示された。バイオ用には触媒に Ni を用いない CNT が望ましい。

また純チタン製デンタルインプラントに隣接した口腔粘膜組織の放射光による X 線吸収微細構造(XAFS)解析を行い、検出した極微量 Ti の状態分析から、金属 Ti 微粒子と anatase 型酸化チタンの両者の場合があることが確認された。

ナノ解像度をもつ新しい顕微鏡として、Wien Filter による高エネルギー分解能に加え感

度の向上を図り、μm を切る空間分解能をも併せ持つ光電子顕微鏡(EXPEEM)および表面原子の X 線励起により元素や電荷状態の違いに応じ変化させた原子間力を検知する X 線励起非接触原子間力顕微鏡法(XANAM)の開発を行った。

VII. 磁性ナノ粒子

C 2 2. 酸化物磁性ナノ粒子の合成と医療応用の検討—センチネルリンパ節検出法への磁性ナノ粒子の適応の検討—

医療応用に用いるための磁性ナノ粒子を合成することを目的とした。共沈法によりマグネタイト粒子径を制御した。また、粒子径、粒度分布を制御したコバルトフェライトを酸化法により合成した。また、金属磁性ナノ粒子の医療応用検討のためポリオールを用いて粒子径を制御したコバルト粒子を合成した。

病巣から最初に転移が起こるとされるリンパ節のセンチネルリンパ節の検出に磁性ナノ粒子を用いることを試みた。共沈法合成マグネタイトをセンチネルリンパ節検出剤として用いた。

C 2 3. ハイパーサーミア (温熱療法) 用磁性ナノ粒子の最適化処理

磁性流体ハイパーサーミア (温熱療法 /Magnetic Fluid Hyperthermia: MFH) は癌患部などに磁性粒子を導入し外部交流磁場を印加することにより、粒子の発熱を引き起こし、加温に敏感な腫瘍細胞を死滅させる癌治療法である。MFH は、1) 外部磁場により目的部位までの誘導が可能、2) 磁性を用いた位置検出が可能、3) 体内深部であっても患部のみの選択加熱が可能、などの利点を持つが、磁性粒子の発熱特性は重要なファクターである。

磁性粒子の発熱に関する理論式から、MFH に最適な磁性粒子は直径 11-13 nm のマグネタイトであり、8 nm 以下の粒子は発熱に寄与しないことを導き、実際にマグネタイトナノ粒子の共沈法による合成後、8nm 以下の粒子を除去するサイズ分級を行った磁性流体では発熱が大きく増加し、最適調整がなされていることが確認された。

C 2 4. ナノ磁性微粒子の生成と物性解析

液相反応法により六方晶系 Mn 置換 Ba フェライト及び La-Co 置換 Sr フェライト等のフェ

ライト系磁性ナノ微粒子、希ガス中蒸発法により金属微粒子を作製し、種々の材質・サイズの微粒子を得た。ナノサイズ化に伴い顕現する飽和磁化値・保磁力値等の特異磁性をメスバウアー分光実験による探索と計算機シミュレーション実験による検証を行った。格子歪導入に伴う歪磁気異方性と単磁区粒子臨界径の増大効果により高保磁力化を達成した。

VIII. 耐摩耗性窒化チタンインプラントの開発

C 2 5. 耐摩耗性インプラント用表面窒化チタンの開発

図 10 にデンタルインプラント（人工歯根）の概念を模式図として示した。人工歯根は怪我、老齢化、その他で歯牙を喪失した場合に顎骨に植立する。顎骨内に埋入された下方歯根部のインプラント表面に直接接触するように新生骨が形成され、インプラントは固定される。顎骨、粘膜を貫通し、口腔内に露出した上部の支台部には歯冠部に相当する上部構造が適合し、咬合・咀嚼機能を人工的に回復する。咬合力として 60kgf 程度負荷される。

チタンは耐摩耗性が劣るため、インプラントの経年使用で発生するアバットメント部(上皮貫通部)の超音波スケーラーによる歯石除去にはステンレスチップのかわりにプラスチックチップを用いている。また人工股関節部の骨頭摺動部では摩耗粉の発生が炎症を誘発し、寿命も規定している。耐摩耗性インプラント用材料として窒化チタンに注目した。

(1) 機械的性質

図 11 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))のピ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 12 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 13 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査を行うと、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。

また 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 2 6. 耐摩耗性窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの開発

(1) 傾斜機能型インプラント

人工歯根は骨内から骨外へ貫通する構造のため、顎骨内埋入部、顎骨外（口腔内）およびそれらの境界部は果たすべき機能と要求される特性が異なっている。しかし現在用いられている多くは先端から基底部まで長さ方向に同一構造、同一材料で構成されている。

インプラントの機能性の発現を最適化するために、傾斜機能材料(Functionally Graded Materials:FGM)の概念を導入し、耐摩耗性窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの開発を行った。デンタルインプラント（人工歯根）の同一製品内において、繰り返し応力が直接負荷され耐摩耗性が要求されるコア部およびアバットメント部(上皮貫通部)に窒化チタンを多く配し、応力緩和・生体親和性を要求する歯根部にはアパタイトを多く配し、各部位間は濃度傾斜させ、界面形成による断絶を引き起こすことなく、物性を連続的に変化させる。

以下、一端を純 TiN とし、長さ方向に濃度傾斜し、他端を HAP 高濃度含有材（例えば TiN-20wt % HAP）となるような試料を TiN/20HAP のように表記する。

図 14 は SPS 焼結温度 850 °C で作製した Ti/HAP および 1200 °C で作製した TiN/HAP 傾斜機能型インプラントである。左から右端へ 10% ずつ 11 段階で HAP 含有量を徐々に増加させ、口腔内に位置する左方部は機械的特性を重視して Ti または TiN を多く、顎骨内に埋入される右方部は新生骨の形成を促すためにアパタイト濃度を多く配し、最右部で純アパタイトとなるようにして骨親和性を重視する構造となっ

ている。また機械的特性も平均ヤング率を徐々に低下させ、骨の物性値により接近させ過重な負荷を顎骨にかけないことを狙った応力緩和型にもなっている。

(2) 生体適合性試験

図 15 はラット大腿骨骨髓腔内に 8 週埋入後の TiN/HAP インプラント周囲の EPMA 元素マッピング像で、試料の染色は行っていない。Ti と HAP の代表元素としてのカルシウム(Ca)の分布を表示している。TiN/HAP インプラントはまず高さ方向に濃度傾斜したより大型(20. x12mm)の傾斜材を放電プラズマ焼結法で作製し、これから長さ方向に濃度傾斜するように 1x1x12mm の角柱状に切り出して作製した。インプラント材内部においては Ti 濃度は左から右方向に行くほど減少しているのに対し、Ca 濃度は逆に Ti とは相補的に次第に増加し、最右部で最強になっており、純 TiN から純 HAP への濃度傾斜構造が確認できる。また Ca 像からインプラント周囲には埋入 8 週を経過した後、新生骨がインプラント全周をおおうように形成されていることがわかる。

新生骨形成は Ti/HAP とほぼ同等の良好な骨親和性を示し、HAP 含有量が高いほどより早期から成熟化が進行した。

IX. 生体吸収性パーティクル・ナノコンポジットの開発

C 2 7. 乳化溶媒蒸発法によるマイクロパーティクル形成

PLGA を溶媒に溶解し、ホモジナイザーによって攪拌することでエマルジョンを作製し、シングルエマルジョン、ダブルエマルジョン中での溶媒の蒸発消失によるポリマーの析出により、単一中空構造から多数の中空球を内包する、サイズ 1 ~ 100 μ m の球状微粒子を作製した。光学顕微鏡下のその場観察により、初期の微小液滴から最終的な微小固体粒子に至る粒子形成過程を明らかにした。

C 2 8. ナノ炭酸化アパタイト/コラーゲン複合体の開発

(1) ナノ炭酸化アパタイト/コラーゲンコンポジット

通常アパタイトは生体中で非吸収性で、骨代替用構造材としてインプラントに使用されるが、

50nm 以下のナノ結晶になると生分解性に変化し、生体に吸収されつつ骨再生を促す骨置換性の機能が発現する。新しい骨置換性材料として、骨に類似したナノ炭酸化アパタイト/コラーゲン(nCHAC)複合体を室温にてバイオミメティック方法で調製した。この複合体は天然骨の同様な 2.8-14.7 wt%の炭酸基を含み、低結晶化度の炭酸化アパタイトナノ結晶と気孔形状を有している。TEM 観察により、天然骨の階層構造に類似した直径およそ 4nm の石灰化コラーゲンファイバー束のミクロ構造が確認され、炭酸濃度により結晶サイズとコラーゲン線維束の構造は変化した。バイオミメティックな組成とミクロ構造を有する nCHAC 複合体は硬組織治療法に有望であり、さらに機械的特性を改善するために生分解性ポリ乳酸-グリコール酸共重合体で強化した骨置換性ナノコンポジット(nCHAC/PLGA)も作製した。

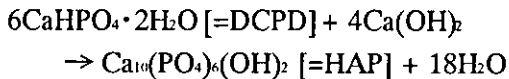
(2) 傾斜機能型 GTR 膜の開発

従来、骨や歯周組織の再生に用いられてきた Guided Tissue Regeneration(GTR)膜は全体にわたり組成と構造が均一なままであった。さらに高機能性を付与するために、傾斜機能材料(FGM)の概念を導入し、ナノ炭酸化アパタイト+コラーゲン/ポリ乳酸-グリコール酸共重合体コンポジット(nCHAC/PLGA)の組成を変えたシートを積層し、アパタイト含有率を厚さ方向に 0% (PLGAのみ) から、最大 5%まで順次変化させた傾斜機能型 GTR 膜を開発した。図 16 は傾斜機能型 GTR メンブレン膜の概念を模式的に示したもので、ポリマー(PLGA)マトリックス中のナノアパタイト石灰化コラーゲン濃度が下面(PLGA)から上面(nCHAC/PLGA)へ傾斜的に変化する。図 17 は作製した 3 層構造の傾斜機能型 GTR メンブレン膜の断面像で、上面は nCHAC/PLGA、下面は PLGA 層である。作製した傾斜型三層構造シートは互いに強く接着し、良好な柔軟性を有しており、片面(デンタルインプラント装着時の内面、顎骨側)は多孔質で骨芽細胞等の成長が容易で骨形成を促し、反対面(口腔粘膜側)は平滑で、粘膜細胞等の付着、侵入と骨癒着を防ぐ機能性 GTR 膜となっている。この生分解性複合膜は、nCHAC 添加により、生体適合性に優れ、天然骨と同等の成分とナノ結晶サイズを有し、in vitro では約 8 週付近から分解速度と

Ca イオンの放出が増大し、高い骨伝導性を示す。MC3T3-E1 骨芽細胞をこの3層複合膜上で培養すると、純PLGA膜よりも、良好な反応性を示した。

C29. 放電プラズマ焼結によるナノアパタイト/CNTコンポジット(nHA/CNT)の作製

HAPの水熱合成:



を乾式で進行させるには、通常大気圧中1200°Cでの加熱が必要であるが、放電プラズマ法(SPS)の適用により680MPaの圧力下500°Cの低温でも生成可能となった。

HAPは脆性材料で破壊靱性が約0.7と低く機械的特性試験用試料作製中でも破損しやすく信頼性に劣る。MWCNTを添加し、焼結圧5-20MPa、焼結温度1200°C付近でSPSで複合材料を作製すると、ビッカース硬さは低下するものの、4wt%添加で、曲げ強さは1.4倍増加し、ビッカース圧痕法での亀裂伸展長さから求める破壊靱性測定試験では亀裂の発生がほとんど認められなくなり、破壊靱性値は6wt%添加で1.7と2倍以上増加した。

これらの靱性向上効果には屈曲性に富むCNTの亀裂伝播阻止効果、および破壊進展時の強度の大きいCNTの引抜き、破断効果で破壊エネルギーを消費すること等が寄与していると考えられる。またCNT焼結バルク体では引抜き効果により、擬似塑性的破壊挙動を示すが、HAPとの複合体では15wt%添加ではこの性質は現れず、40wt%添加の複合材料で検証中である。

この複合体組織、ナノアパタイト/カーボンナノチューブコンポジット(nHA/CNT)は弱い分子間力で結合されたMWCNTと50nm以下のHAP粒からなり、コラーゲンとともに骨を構成するナノHAP微結晶とサイズと構造が類似していることは興味深い。

X. 光触媒

C30. 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。これを用いて可視光を照射した際、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)で修飾したCuイオン修飾二酸化チタンでは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。

Cu, Pd, Au, Agについて可視光応答型光触媒能の修飾金属イオン種依存性を比較するとAgが最もよい成績を示した。

図18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19はAgイオン修飾二酸化チタン光触媒を用いたヒト天然歯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。

XI. ナノ構造制御高分子ゲル

C31. 医療用アクチュエータへの応用

体内に挿入した際、体組織を傷つける可能性がある従来の医療用カテーテルに比べ、Nafion、PANゲル等の含水性電気駆動型電解質高分子膜は材質が生体組織に近く、ヒトにやさしいアクチュエータである。しかし応力緩和による発生力の低下のため持続性に問題があった。含水率が高く数日で劣化するNafionの表面をドータイト塗布およびPMMA被覆することにより、大気中数週間までの劣化抑制を可能とし、弾性率の向上と発生力の約6倍増を達成した。また持続性に問題があった屈曲制御性についても、銀メッキSelemon高含水性電解質高分子イオン交換膜に脱水処理を施すことにより、銀メッキ層の酸化還元反応機構に基づく、数時間を越える長時間高精度電界屈曲制御性を実現した。心臓や四肢の柔軟な動きを模倣するマイクロポンプと最大流量900ml/minに達するポンプを試作した。