

作用が重要である。しかし、イオン溶出する金属もサイズ依存性を示し、サイズが小さくなるほど細胞反応は強くなり、細胞生存率は有意に低下した。これはイオン溶出量の実験からもわかるように表面積の大きさが影響していると考えられる。微粒子になると微量でもかなり大きな表面積を持つためイオン溶出量も格段に増加する。

第二に生細胞に反応を惹起させる臨界寸法を測定することを目的とし生化学的アッセイを行った。結果として50nmの二酸化チタン微粒子に対しても細胞は反応し、サイトカイン等の放出を検出した。細胞が無反応となる粒子は50nm以下であることが示唆された。しかし、この反応は3 μ m³500nmの粒子に比べ有意に低く、細胞が処理しない、もしくは出来ない大きさである可能性がある。ナノ粒子は健康評価において影響があると判定されており、肺胞マクロファージにおける活性酸素の誘導以外にも量-効果関係が確認できた。その結果ではin vitroではナノ粒子はサブマイクロに比べ細胞への直接的影響は小さかった。さらに純粹にこの大きさを分散出来る方法でin vitro/in vivoで実験する必要がある。

第三に粒形による炎症反応の違いを二酸化チタンの塊状粒子と針状粒子を

用いて調べた。針状の粒子は同じサイズの球状粒子に比べると為害性が強く、炎症性サイトカインの放出は有意に高かった。また、針状の粒子もその大きさによるサイズ効果が認められた。ただ、材料の種類による違いもナノレベルの粒子では大きな要因となると考えられた。先のアスベストとのかねあいもありCNT、アスベスト各種と比較検討する必要がある。我々の実験では炭素ナノチューブでは血管拡張などの炎症は生じたが肉芽腫の発生は確認できていない。確かに形状的にはアスベストと似ており精査が必要であるがヤング率などの物理的特性が異なる。実際、我々の研究では塊状粒子よりも針状粒子の方が同一サイズでは細胞に障害を起こし、細胞のサイトカイン産生量に影響を与えたが、同一サイズのCNTにそこまでの傷害性は認めなかった

ナノ粒子の製造と使用はアメリカでもその他のどこでも規制はまったくない。さらに産業界もナノ粒子の製造、使用、廃棄における安全な取り扱いのための規準をなんら規定していない。ナノ粒子の環境及び人間の健康への影響については検証がほとんど行われていない。我々の実験では50 μ m以上の粒子は呼吸によって侵入することはない。しかし生体内では摩耗によって生

じることがある。ただこれらサイズの粒子はマクロのバイオマテリアルとほとんど同じ生体反応を生じ影響は小さい。サブマイクロの粒子状物質は、肺に吸い込まれるとマクロファージなどの免疫細胞に捕食される。その結果周囲に炎症を起こす。またこのレベルの摩耗分は生体内で長く影響を及ぼす。その結果、細胞に取り込まれた粒子が他に運ばれず貪食、集積、貪食のループを繰り返し、放出される活性酸素、サイトカインによる炎症が組織を傷害するためおそれがある。ナノ粒子は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。マクロファージなどの異物除去反応が機能しない50nm未満の粒子は全身に循環してしまうことが考えられる。その結果が蓄積されるのか、排出されるのか、細胞内にはどのように侵入し影響を及ぼすのか検討が必要である。ナノ粒子は粒が小さいので、単位重量あたりの表面積が粒の大きな粒子より大きい。ナノ粒子の周囲に付着した大量の有機物が人体に悪影響を及ぼす可能性も考えられた。さらに、ラットの大食細胞（マクロファージ）、通常これが肺に入る異物を処理するが50nm以下のナノ粒子を処理できない可能性が明らかになった。これは50nm以下の粒子に対する

マクロファージの反応が低下する結果から導き出される。逆にこのサイズであれば粒子にステルス機能を持たせ、ドラッグデリバリーシステムなど生体応用が可能かもしれない。

以上の研究からナノ・マイクロ微粒子の生体為害作用には生体固有の大きさと粒子のサイズによって決定される材質非特異的な物理的なサイズ効果があることが明らかになった。(Fig. 24) また、粒子の形状や物理的な特性も細胞為害性に影響する可能性が考えられる。今後ナノテクの安全性の確保や応用には、このサイズ効果を考慮する必要がある。

E. 結論

一般に材料の組織為害作用は細胞障害を引き起こすイオン溶出による化学的効果が大きい。しかし、マイクロ・ナノ微粒子になるとサイズや形状といった物理的特性による影響が大きくなることが明らかになった。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。

ナノ・マイクロ微粒子の *in vivo* および *in vitro* での組織反応を検索することを目的として、動物埋入実験および細胞実験を行い、以下の結論を得た。本年度は、粒子の改良、実験系の改善でより詳細なデータをとることが出来た。その結果、ナノ・マイクロ微粒子に対する *in vivo*・*in vitro* での反応のメカニズムに関する有益な知見が得られた。

1. 微粒子の生体親和性および為害性はサイズに影響されることが示唆された。また、その為害性は細胞の炎症反応が関与していることが示唆された。
2. 化学的に影響を及ぼさないバイオマテリアルの微粒子はマクロの材料とは異なり炎症反応を惹起する。長期的には炎症症状は沈静化するが、微粒子は残留する。さらに小さなナノ粒子になると生体の防御機能を免れ全身に拡散する可能性がある。
3. 微粒子に対する細胞の反応はサイズによって影響を受ける。その一番大きな要因としては細胞が取り込むことが可能な大きさかどうかということである。次に粒子自体の問題が考えられた。ナノ・サブミクロン粒子は凝

集して二次粒子を作ったり、静電的な力によると考える細胞膜への集積を認めた。この結果貪食できる大きさになったり、細胞膜への刺激になったりすると考えられた。

4. 微粒子が異物反応を誘発した場合、マクロのバイオマテリアルとは異なり炎症反応を惹起し、周囲組織に損傷、創傷治癒の遅延をおこしうることが示唆された。
5. 微粒子を取り込んだマクロファージは局所でサイトカインを放出した。周囲細胞はそれにより炎症を発現する可能性が示唆された。また、動物実験から粒子を取り込んだ細胞により微粒子が凝集しさらに細胞に取り込まれ集積していく仮説が考えられた。
6. カーボンナノチューブ (CNT) およびカーボンナノファイバー (CNF) を皮下組織に埋入した場合、周囲組織に短期的な炎症症状が発現する。長期に持続する強い炎症反応は惹起せず、線維化により被包化され凝集した。
7. サブマイクロ粒子の多くはマクロファージや周囲細胞に取り込まれる。それらは異物として生体反応を惹起する。しかし、ナノ粒子に対する反応はサブミクロンレベルの粒子と比較すると弱かった。この特性がステルスバイオマテリアルとしての利用とし

て有効なのか、もしくは生体に未知の害を与えるのか、時間的、量的検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Ryuichiro Kumazawa, Yasunori TOTSUKA, Fumio WATARI, Effects of Particle Size on Cell Function and Morphology in Ti and Ni, Materials Transactions JIM, 43(12), 3052-3057
- 2) Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Tsukasa AKASAKA, Rosca IOSIF Daniel, Motohiro UO, Yasunori TOTSUKA, Fumio WATARI, Effects of Micro/Nano Particle Size on Cell Function and Morphology, Bioceramics Vol. 16, 909-913, (2003)
- 3) Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Tsukasa AKASAK, Rosca IOSIF Daniel, Motohiro UO, Yasunori TOTSUKA, Fumio WATARI, Pathobiological Response of Carbon nano-tubes and Micro/nano particles, 傾斜機能材料論文集FGM 2004, 22-27.

(2004)

- 4) Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Yasunori TOTSUKA, Fumio WATARI, Effects of Ti, Ni and Fe particles on Cell Function and particle size dependent cytotoxicity, J Biomedicine, under submission
- 5) 亘理文夫、田村一央、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、戸塚靖則、古月文志、佐藤義倫、田路和幸、微粒子と生体反応, ナノ学会会報 2(1), 33-37, 2003
- 6) Iosif ROSCA, Fumio WATARI, Motohiro UO, Tsukasa AKASAKA, Kazuchika TAMURA, Mechanism of biodegradable polymer microparticle formation by emulsification solvent evaporation method, 傾斜機能材料論文集FGM 2004, 87-92
- 7) Fumio WATARI, Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Takao KOHGO, Motohiro UO, Yoshinobu NODASAKA, Tadahumi DOMON, Yasunori TOTSUKA, Size Dependence of Cytotoxicity in Fine Particles of Titanium, Nickel and Other, Archives of BioCeramics Reseach 4(1) 78-84

2 学会発表

- 1) ○田村 一央、高師則行、宇尾基弘、

- 赤坂司、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亙理文夫, Cytokines emission of macrophages by carbon nano particle, 第25回フラーレンナノチューブシンポジウム, 平成16年1月,
- 2) ○ Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Motohiro Uo, Fumio WATARI, Yasunori TOTSUKA, Size-Dependent Effects of micro/nano Dental Particles, The 82st general Session of the International Association for Dental Research, Honolulu Mar. 2004
- 3) ○田村 一央、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亙理文夫, ナノ・マイクロ微粒子の生体への影響 - 歯科診療で発生する微粒子の細胞への影響 -, 第43回日本歯科理工学会, 平成16年4月, 歯科材料・器械 24(2) 115 (2004)
- 4) ○ Kazuchika TAMURA, Noriyuki TAKASHI, Motohiro Uo, Fumio WATARI, Yasunori TOTSUKA, Biologic effects induced by micro/nano particles in vivo and in vitro study, The 7th International Biomaterial, Sydney May. 2004
- 5) ○田村 一央、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亙理文夫, ナノ・マイクロ微粒子に対する in vitro および in vivo での細胞・組織反応, 第26回フラーレンナノチューブシンポジウム, 平成16年7月,
- 6) ○田村 一央、戸塚靖則、亙理文夫, Biologic effects induced by micro/nano particles in vivo and in vitro study, 第46回歯科基礎医学会, 平成15年9月, 歯科基礎医学会雑誌 46(4) 77 (2004)
- 7) ○田村 一央, 生体反応に及ぼす微粒子のナノトキシコロジー効果, 平成16年度北海道歯学会, 平成16年11月
- 8) ○田村 一央、熊沢龍一郎、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亙理文夫, ナノ・マイクロ微粒子バイオマテリアルの組織障害の機序, 第26回バイオマテリアル学会・抄録集 26(4) 202 (2004)

Fig.1

Material 材料の調整

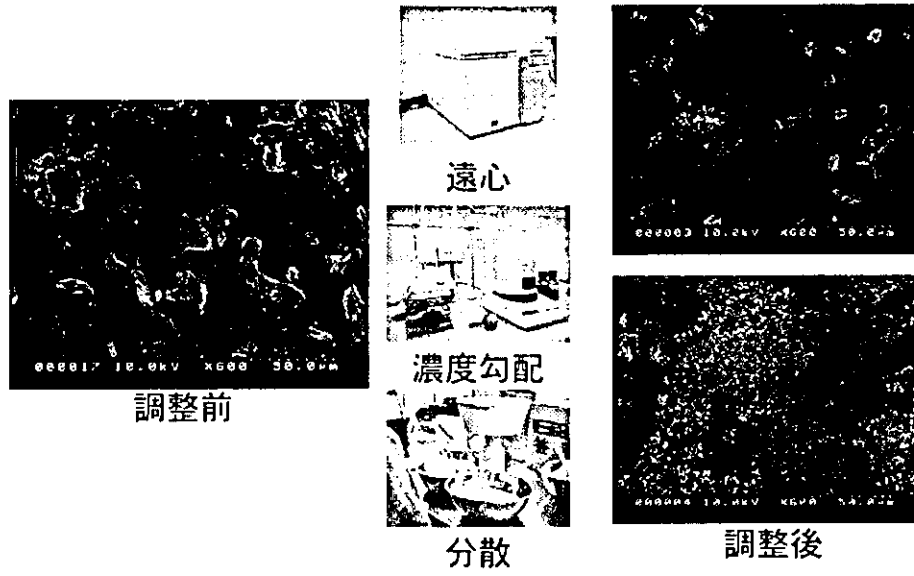


Fig.2

Materials Ti 微粒子

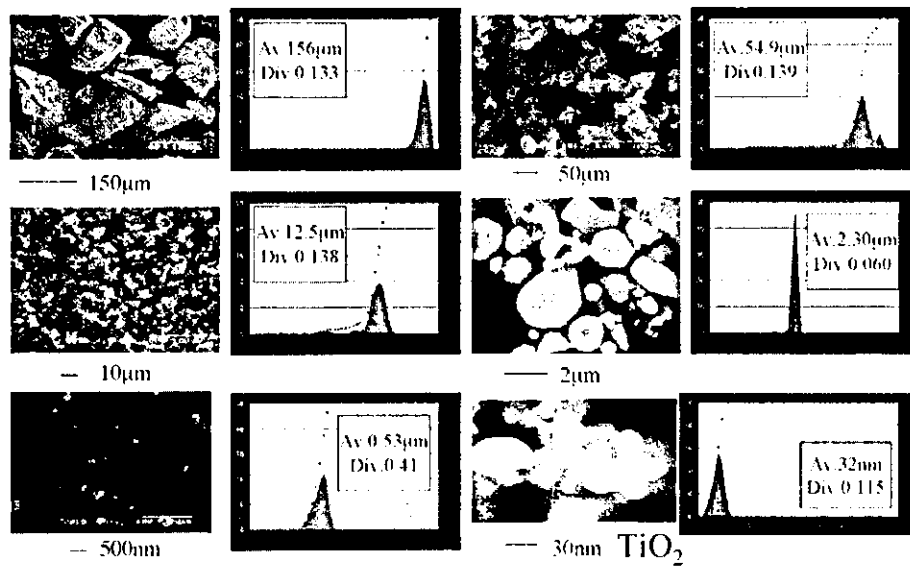


Fig.3

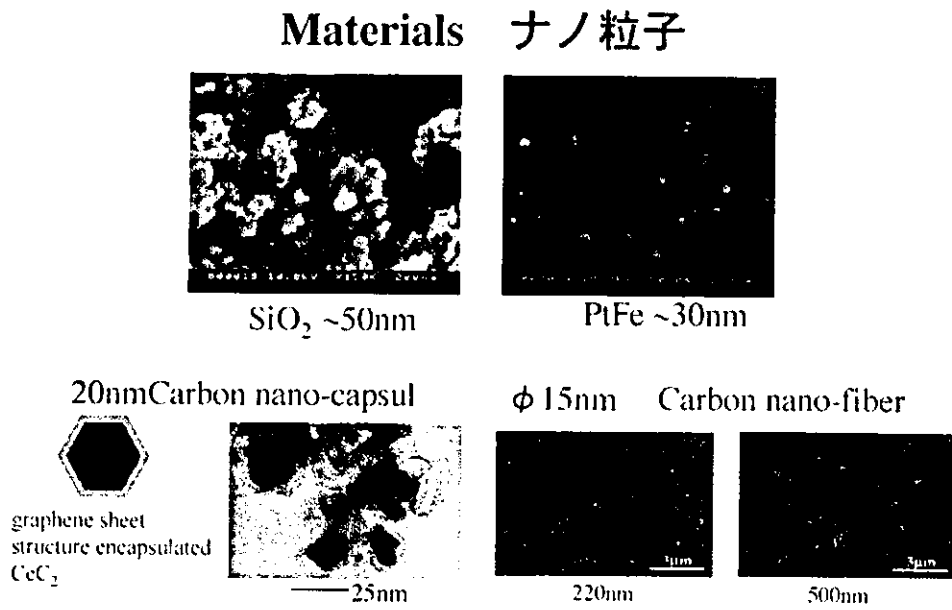


Fig.4

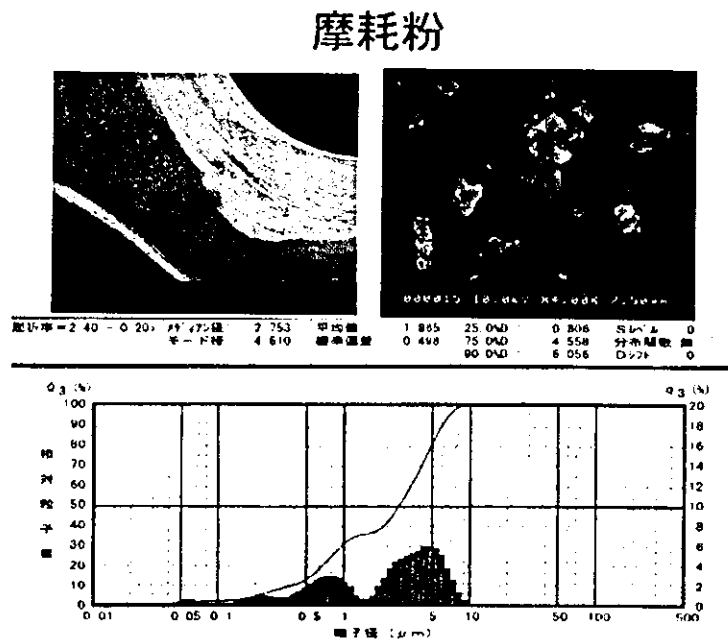


Fig.5

Results Ti/Fe/Niのイオン溶出量

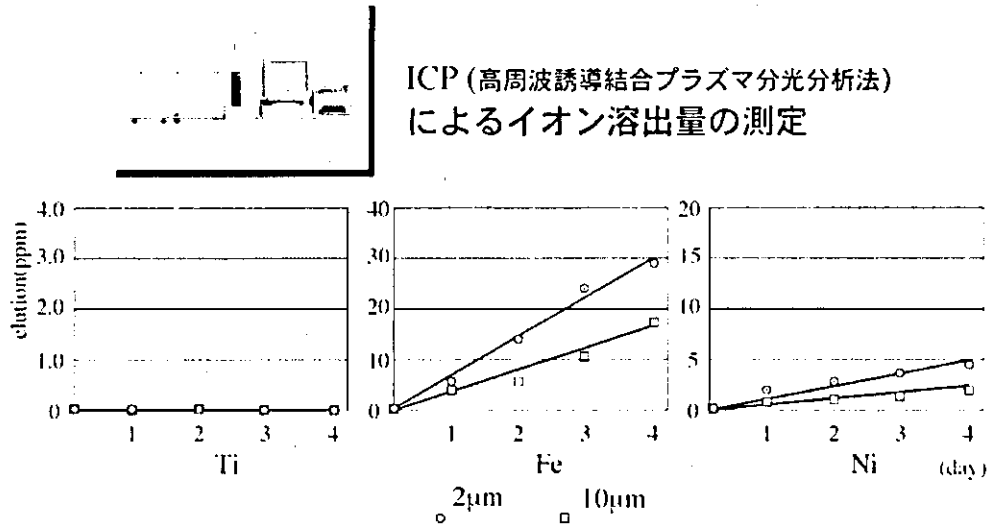


Fig.6

チタン化合物の微粒子によるマクロファージのTNF- α 放出量

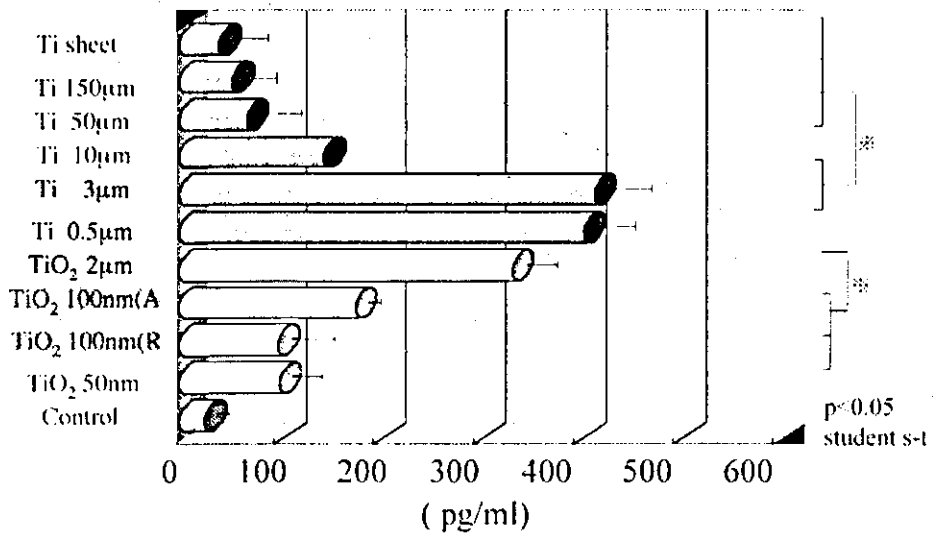


Fig.7

ナノ粒子に対する 肺胞マクロファージの反応

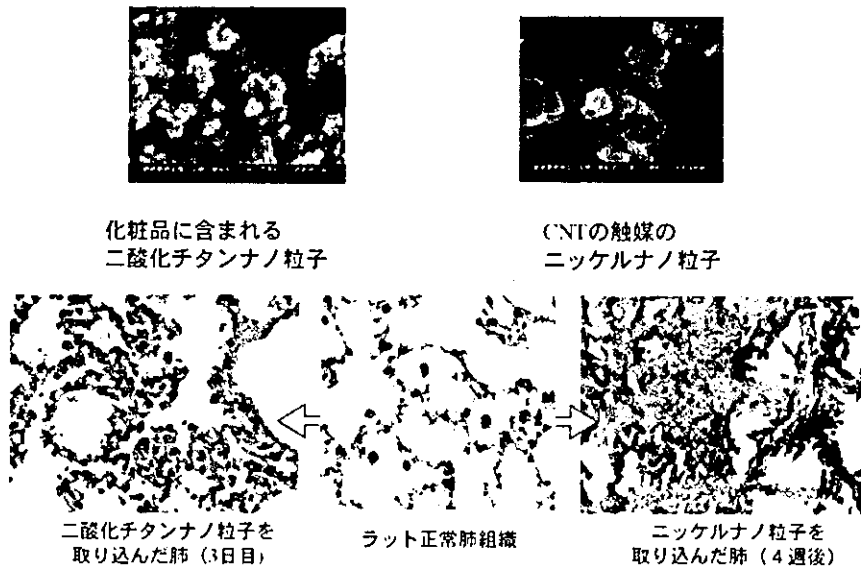


Fig.8

呼吸によって取り込まれたナノ粒子

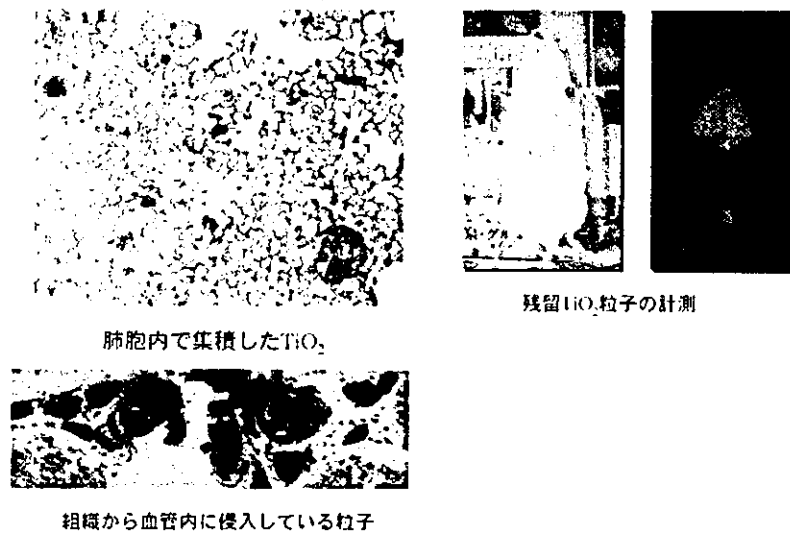


Fig.9

ナノ粒子埋入1週

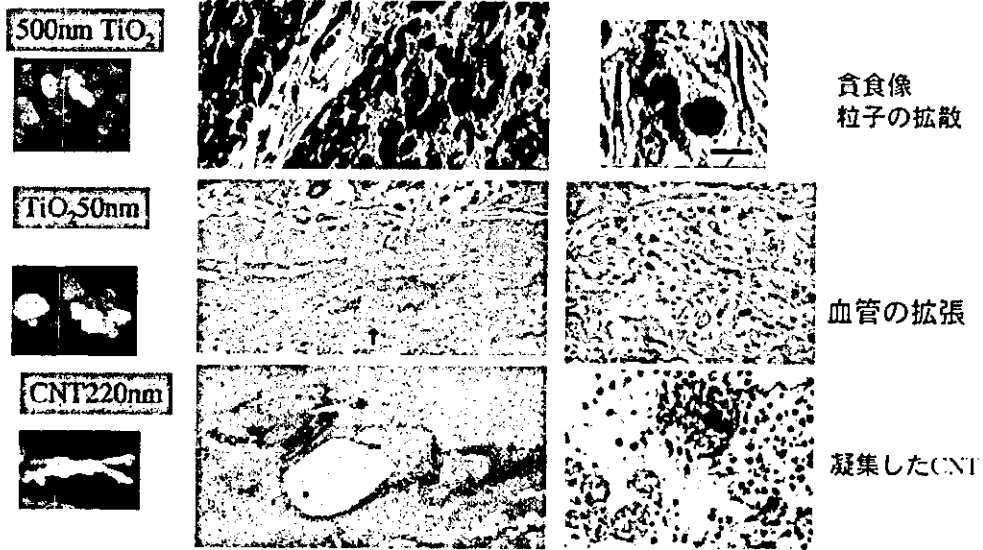


Fig.10

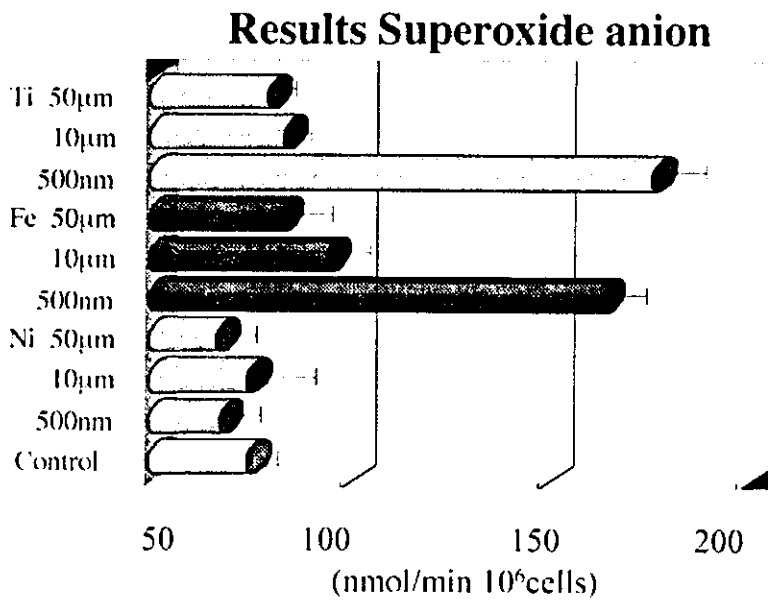


Fig.11

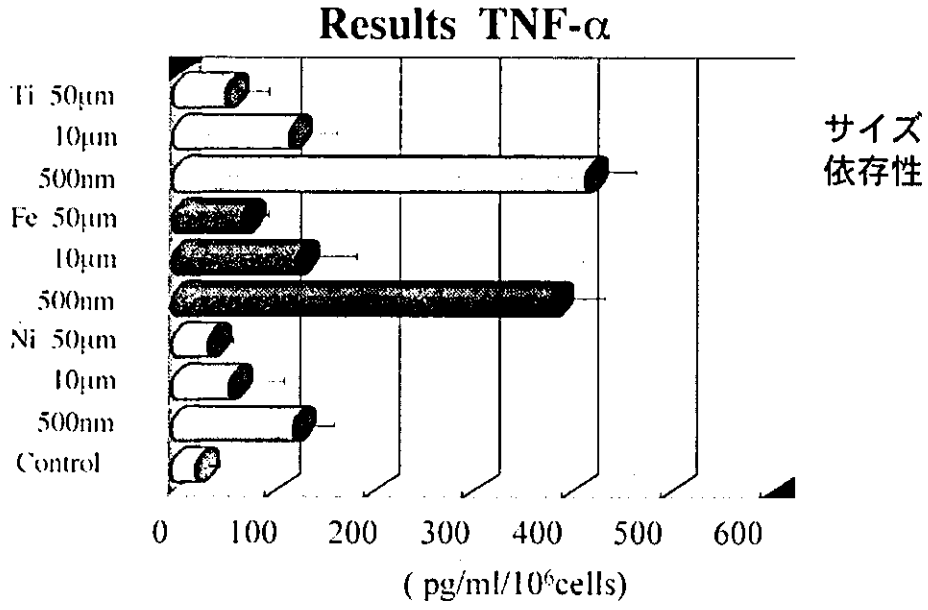


Fig.12

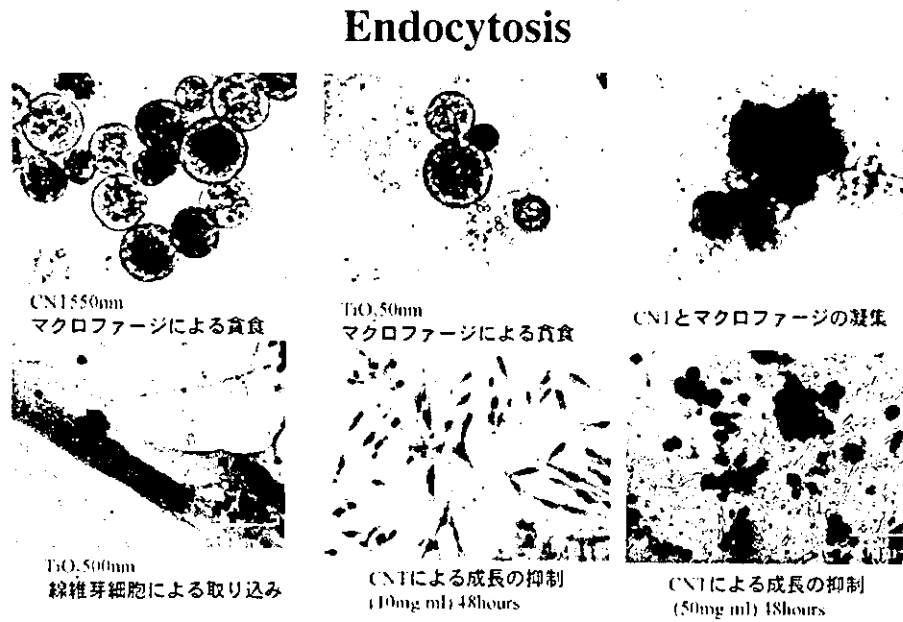


Fig.13

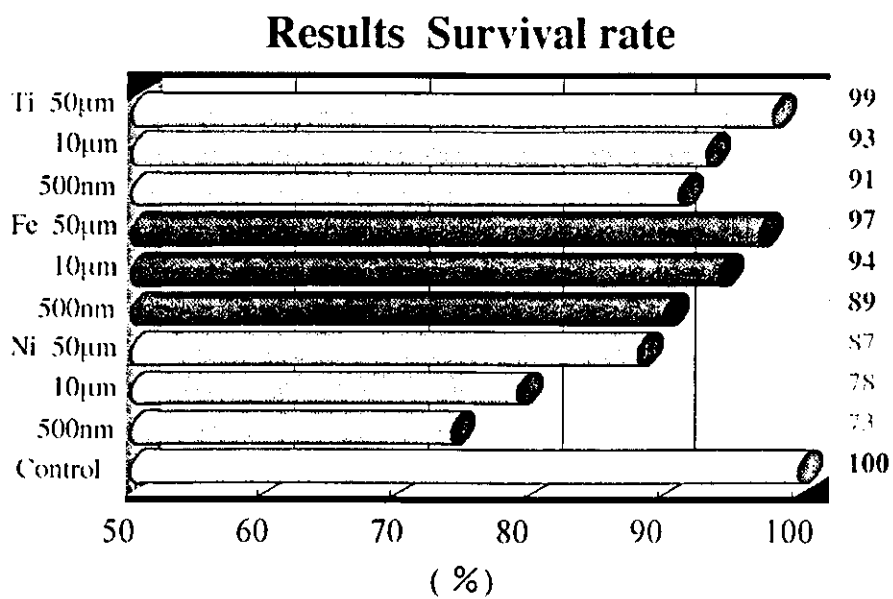


Fig.14

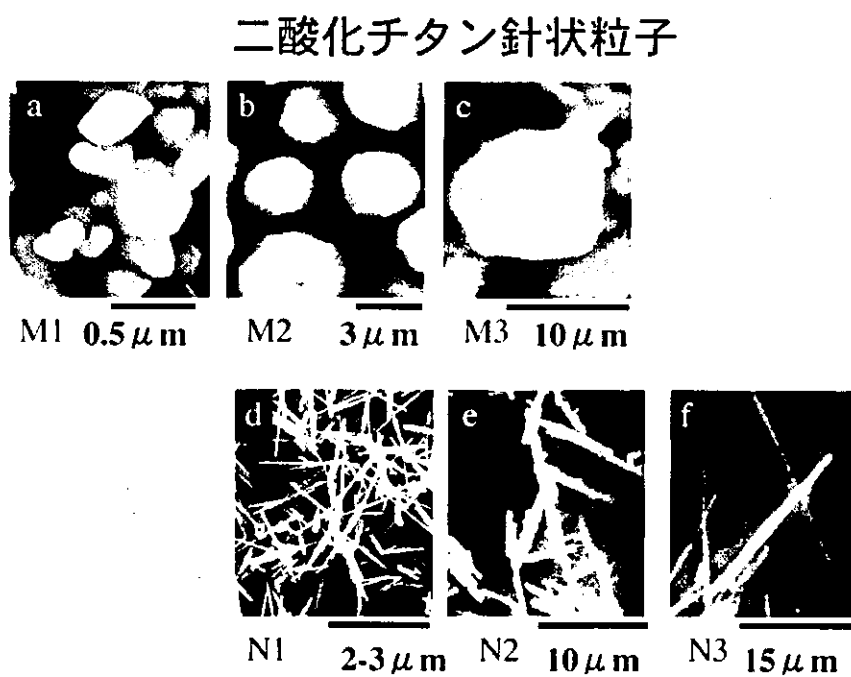


Fig.15

Results Shape effect (1)

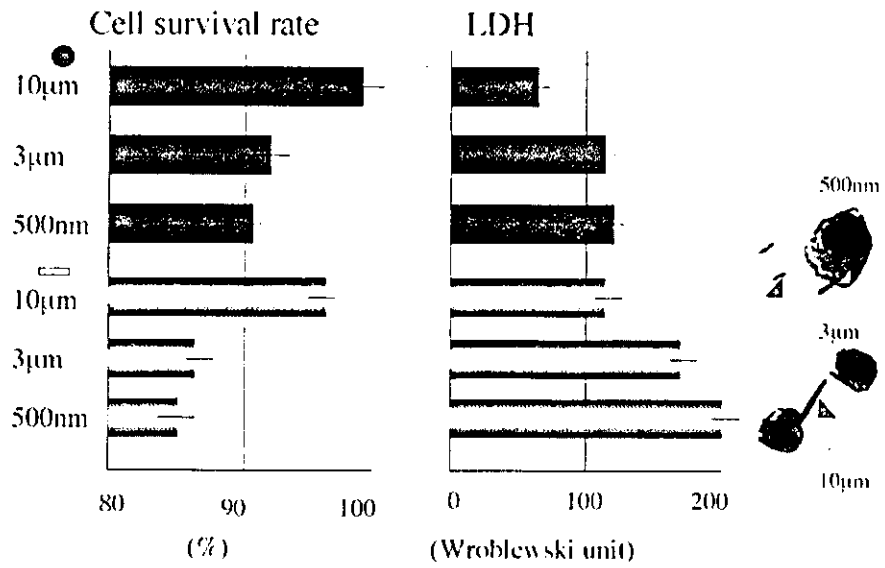


Fig.16

Results Shape effect (2)

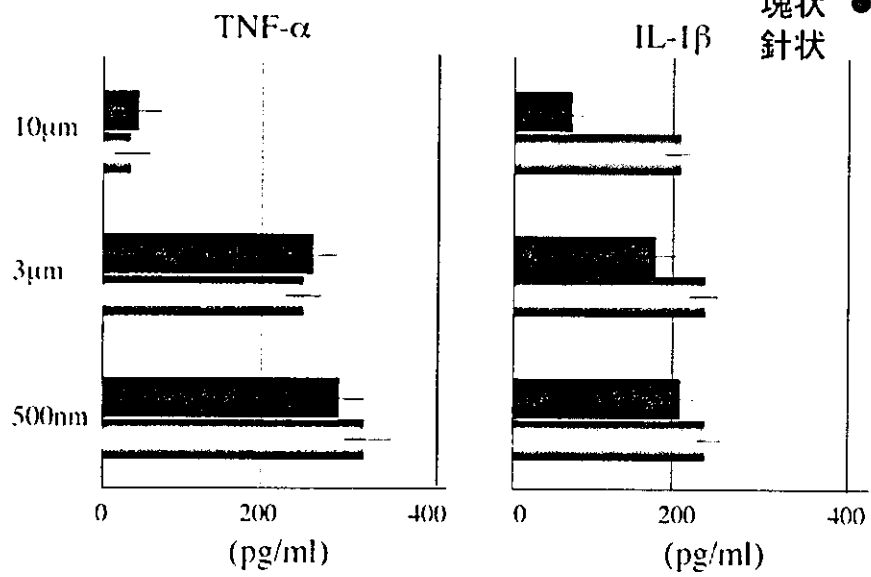


Fig.17

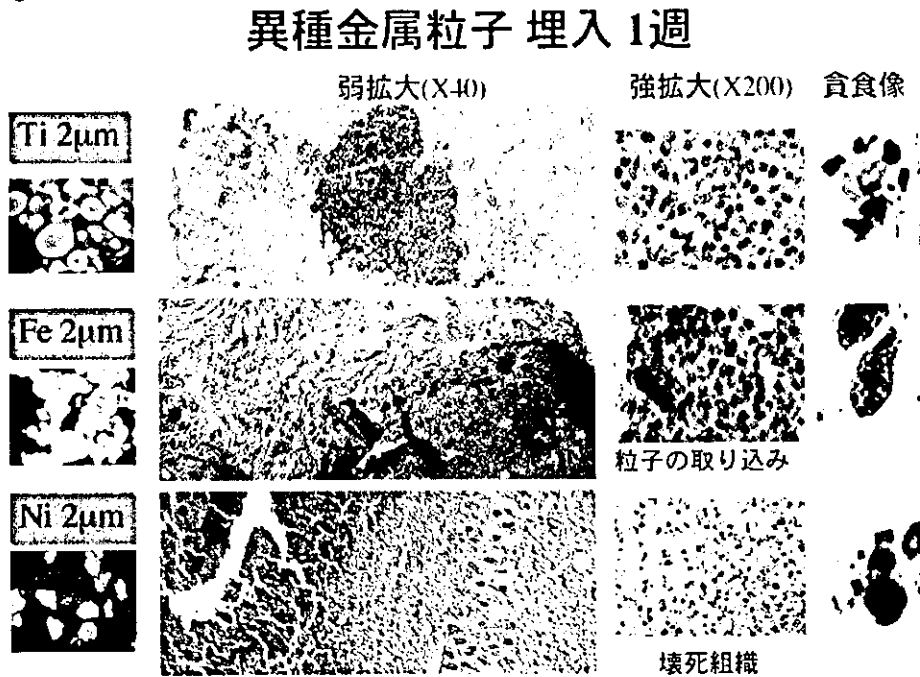


Fig.18

Hypodermal tissue of Rat (long term) Ti

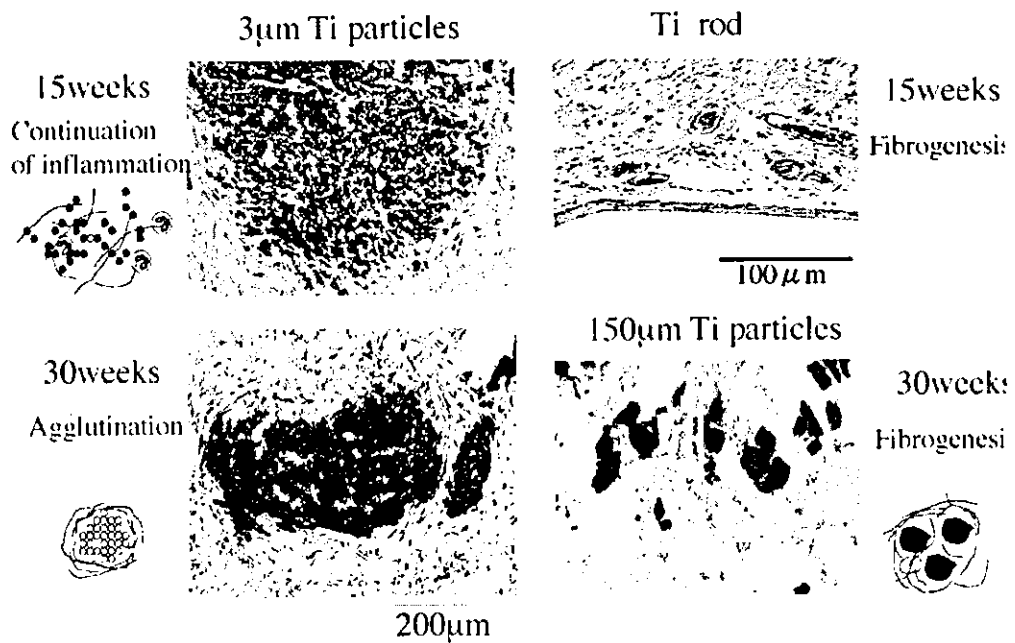
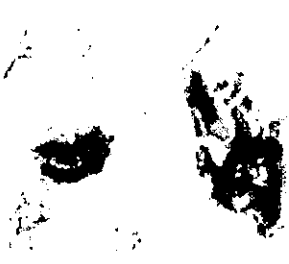


Fig.19

Hypodermal tissue of Rat (6M) Fe



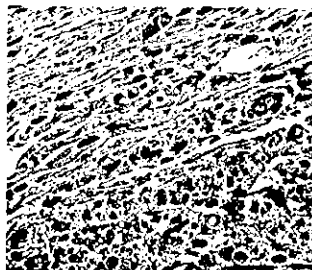
Fe粒子埋入部の
周囲は腫脹し
黒色に変化して
いた。



Feイオンの沈着は
広範にわたり炎症
を認める。
組織は強く傷害
されている。



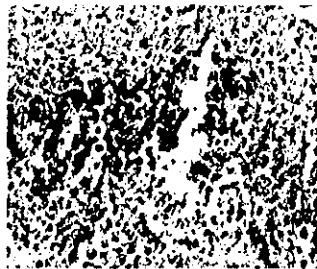
組織は年輪状に
何層かに線維化
を繰り返しており、
イオン溶出
沈着（析出？）
による影響が
認められる。



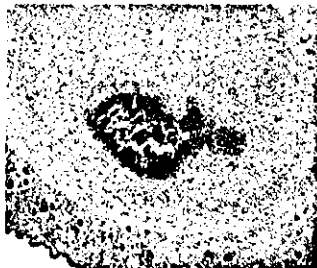
境界部分では
明らかに線維に
よる被包化が
生じているが、
周囲にはさらなる
イオン溶出と沈着
を認める。

Fig.20

Hypodermal tissue of Rat (long term) Ni



Ni埋入直後
細胞浸潤が
著しい



Ni埋入後1M
同心円状に
壊死層と
強い細胞浸潤
炎症層を
認める



Ni埋入後6M
3匹のラットのうち
2匹に腫瘍が生じた。



扁平上皮癌

Fig.21

Hypodermal tissue of Rat (6M) CNT

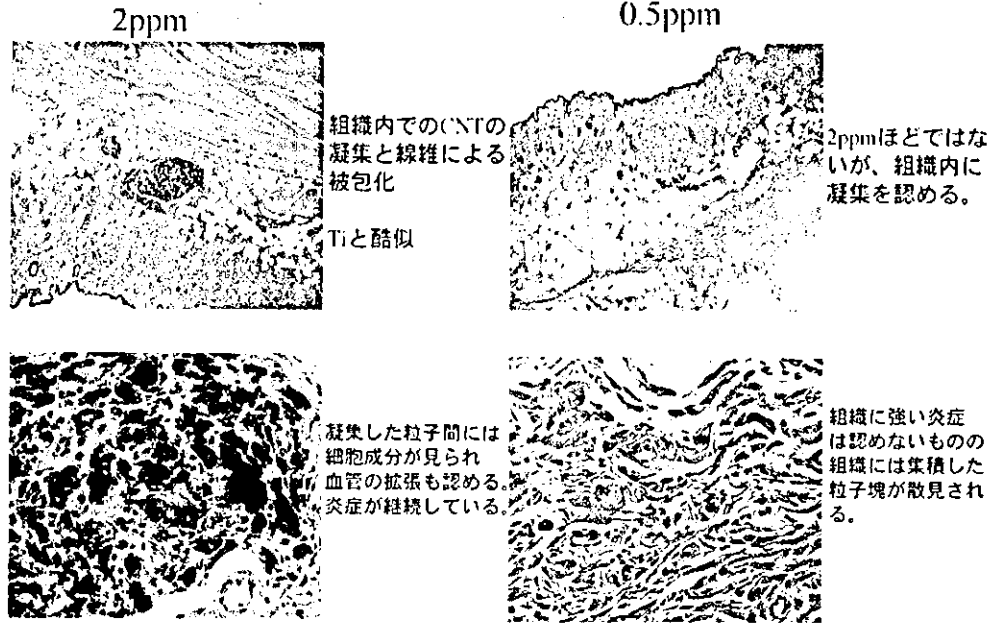


Fig.22

Results TNF- α

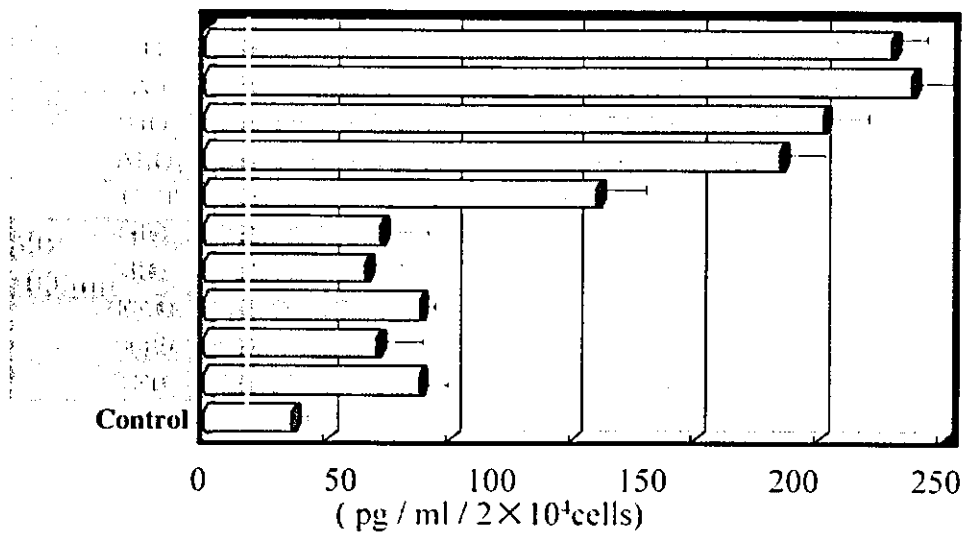


Fig.23

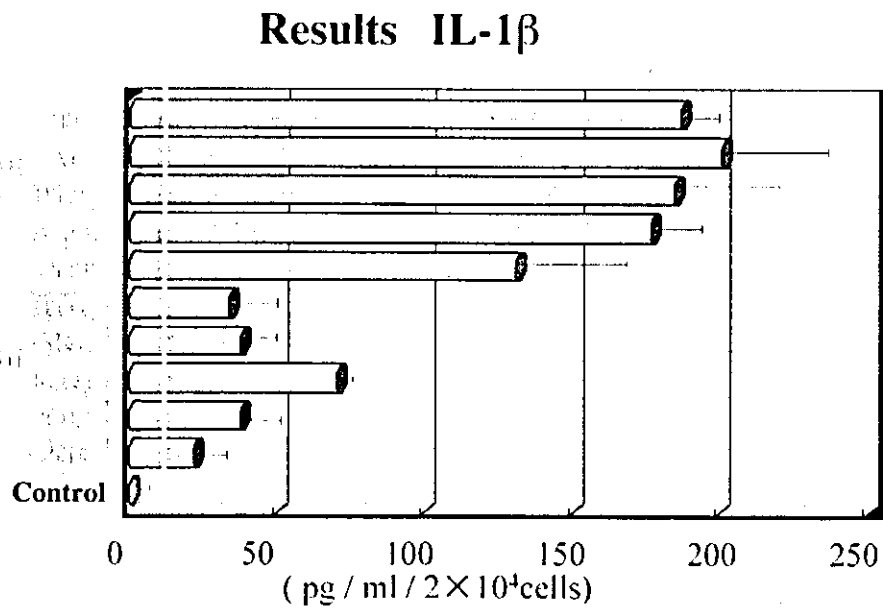


Fig.24

Size effect and cell reaction

particle size	size	cell reaction	application
10mm			
1mm	organ	Fibrogenesis	Tablet
100 μ m			Granule agent Powder medicine
10 μ m	cell		
1 μ m	capillary	Endocytosis	
100nm	abnormal vascular endothelium virus		
10nm	normal vascular endothelium	Tissue penetration	
1nm	cell membrane	General circulation	
0.1nm	carbon combination		

分担研究報告書

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

分担研究者 大森 守 東北大学金属材料研究所助教授

（平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月）

研究協力者 大森 守 東北大学工学研究科研究支援者

（平成 16 年 4 月～平成 17 年 3 月）

研究要旨 カーボンナノチューブはかさ密度は小さいが、強度とヤング率とは大きい。炭素系材料はかつて心臓の弁として使われたことがあり、生体に対して重大な問題を引き起こすことはない。このカーボンナノチューブを利用すれば、軽くて強度の大きい人口骨などの生体材料を作ることが可能性と考えられる。単層カーボンナノチューブは合成が困難でその価格は非常に高いので、利用しやすい多層カーボンナノチューブを用いた。ハイドロキシアパタイトは生体活性に優れているが、強度と靱性が小さくその応用範囲が限られている。この欠点を改善するために、多層カーボンナノチューブで補強し、強度と靱性の大きな生体活性材料とする開発研究を行った。原料には高温で反応してハイドロキシアパタイトになる 6 モルの $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と 4 モルの $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を使用した。複合材料の焼結には放電プラズマシステム(SPS)を用いた。二つの化合物からのハイドロキシアパタイトの生成に関する詳細は不明で、さらに SPS を使った場合の生成反応は全く分かっていない。高性能の複合材料の合成するために、二つの原料からのハイドロキシアパタイト生成反応を明らかにした。さらに多層カーボンナノチューブそれ自体を固化することで、軽くてヤング率が人工骨に近い材料の開発を行った。多層カーボンナノチューブを SPS でも固化できなかったので、フェノール樹脂を添加しそれから生成する非晶質炭素で、多層カーボンナノチューブを結合し、その固化体を合成した。この多層カーボンナノチューブ固化体は生体活性ではないために、その表面にハイドロキシアパタイトの被覆を行った。

でいるため、

1. 放電プラズマシステム(SPS)の効果を利用したハイドロキシアパタイト合成

人工骨あるいは人工歯根としての応用に多くの

A. 研究目的

合成セラミックスであるハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)の化学組成は骨に類似し、セラミックスの中では最も生体活性に富ん

待が寄せられ、かつこれまで利用もされている。このハイドロキシアパタイトの粉体とその焼結に関しては多くの研究が古くからなされてきた。粉体の合成の主な方法は、析出法、加水

分解法、水熱合成法であるが、これらの方法のいずれにおいても生成反応に水が関わっている。これら以外に、6モルの CaHPO_4 (DCP) と 4モルの Ca(OH)_2 (CHO) との反応でハイドロキシアパタイトが生成すると報告しているが、その詳細は明らかではない。

ハイドロキシアパタイトに関し、研究が始まったばかりの時は、骨の代わりに用いることが目的とされてきたが、その強度と靱性が小さいことから、Ti にその役割を代わられている。そのため最近では、ハイドロキシアパタイトを生体に埋め込み、それを吸収させて新しい骨が再生するような使い方が望まれてきている。しかし、このような新しい応用に対応するためには、新技術を利用した合成法によって新しい組織とすることも必要になっている。

放電プラズマシステム (SPS) は、1960 年代にジャパックス社 (株) の井上潔らによって開発された。Fig.1 に示されるように、本装置は加圧熱処理炉であり、直接加熱のホットプレスとも言えるが、通常の間接加熱ホットプレスとは電源が異なっている。すなわち、この装置の加熱用の電源はパルスの直流発生装置であり、これから直接に型に電流が流される。これによって、次のような効果が期待できる。1. 塑性変形の促進：電界塑性 (Electroplasticity) といわれるパルス電場中での転位の移動促進現象が明らかにされている。2. 物質の拡散促進：電気の流れが導体中の原子の拡散を促進する現象は電子流動 (electromigration) と言われている。電場中ではイオンの拡散が促進される。3. 放電プラズマ発生：粉体からの急速な脱ガスやある種の有機化合物の反応により、電磁波の発生が考えられている。4. 表面電流による分子・物質移動促進：粉体試料の表面を電流が流れ、それが分子の移動を促進して結晶成長を促し、短時間での大き

い結晶育成に貢献している。5. 急速昇温：間接加熱ホットプレスとは異なり加熱用ヒーターや断熱材がないため全体の熱容量が小さく、急速に温度を上げることが可能で冷却も早くなる。

6モルの $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCHP) と 4モルの Ca(OH)_2 (CHO) とから、固相法によるハイドロキシアパタイトの生成を調べるのが本研究の目的である。特に、これまでに試みられてこなかった SPS を使ってこの固相反応を行い、そのハイドロキシアパタイトの生成温度に対する効果を加圧力との関連で調べた。

B. 研究方法

本研究で使用したのは $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCHP) と Ca(OH)_2 (CHO) と (和光純薬製、特級) である。これらをメノー製の乳鉢で 20 分間混合して使用した。ハイドロキシアパタイトの合成には放電プラズマシステム (SPS) (住友石炭製、SPS1050) を使用した。混合した原料を超硬あるいは黒鉛型に詰め、SPS を用い 300°C から 1200°C の温度範囲で、圧力を 20MPa から 670MPa と変え真空中で反応を行った。比較のために、空気中で混合原料を 500°C - 1200°C の範囲で加熱してハイドロキシアパタイトを生成させた。反応した試料を X 線回折装置 (理学電機製、ロータフレックス RU-200B) によってハイドロキシアパタイトの生成を調べた。DCHP の熱分解を示差熱量分析装置 (DSC) (セイコーイッスツルメント製、SHDSC 6300) で調べた。得られた試料の結晶の大きさを走査型電子顕微鏡 (SEM) (日立製、S-800 および日本電子製、JXA-8621MX)、および透過型電子顕微鏡 (TEM) (日本電子製、JT-001) によって観察した。

C. 研究結果

C.1. 電気炉中での反応

DCPD の示差熱量分析装置の測定の結果は、149°C で結晶水を失って CaHPO_4 (DCP) に変化し、この DCP は 460°C で分解を始めることを示している。CHO は 900°C に加熱しても構造変化は起きないが、1000°C に加熱すると分解して CaO になることが X 線回折によって確かめられた。電気炉を用いて空气中で 6 モルの DCPD と 4 モルの CHO とを反応すると、500°C までハイドロキシアパタイトは生成しない。600°C で 1 時間反応するとその生成が観察される。Fig.2a に示すように生成したハイドロキシアパタイトの回折ピークの半値幅は大きく、結晶の大きさは小さいことが分かる。不純物も多く含まれているが、それが何であるかは同定できていない。600°C で 10 時間反応するとハイドロキシアパタイトは他の安定な化合物に変化している。600°C で生成したハイドロキシアパタイトは、回折ピークの半値幅から判断して核と呼ばれる小さな結晶であり、それは不安定でもある。1200°C で 1 時間反応した試料の X 線回折を Fig.2b に示す。不純物が存在するものの、この温度でハイドロキシアパタイトの生成が確かめられた。1200°C で 10 時間反応してもハイドロキシアパタイトと一緒に生成する不純物の量には変化がない。この不純物中には $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\beta\text{-TCP}$) は含まれてはいない。

C.2. SPS による反応

SPS を使って 6 モルの DCPD と 4 モルの CHO とを反応した結果、Fig.3 に示すように 300°C で 600MPa の高圧力にするとハイドロキシアパタイトの生成が始まる。しかし、この条件に 1 時間保持しても、ハイドロキシアパタイトの生成量は少し増加するのみである。加圧力を 670MPa と高くすると、ハイドロキシアパ

タイトの生成量は多くなるが、それでもかなりの未反応の原料が残っている。500°C と温度を高くし、670MPa と高い圧力で 10 分間反応すると、Fig.4c に示すようにハイドロキシアパタイトが得られる。このときハイドロキシアパタイトと一緒に不純物も生成しているが、1 時間と長く反応してもこの不純物の量が減少することにはなかった。このハイドロキシアパタイトの X 線回折図のピークの半値幅は大きく、結晶が小さいか欠陥が多いかを示している。500°C でも加圧力を 20MPa と小さくすると、Fig.4d に示すように不純物が多くなりハイドロキシアパタイトの生成は少なくなる。600°C と温度を高くすると加圧力を 600MPa と低くしても、Fig.5e に示すようにハイドロキシアパタイトが生成する。470MPa の加圧下において 700°C で反応した生成物の X 線回折図を Fig.5f に示す。この温度で得られたハイドロキシアパタイトは不純物が共存していない。反応温度を 1000°C と高くして 120MPa で反応した生成物の X 線回折図を Fig.5g に示す。この図からわかるようにハイドロキシアパタイトが生成し、同時に不純物の生成も見られる。この不純物が何であるかは同定できていない。さらに、温度を 1150°C と高くすると、Fig.5h に示したように 20MPa の低圧でもハイドロキシアパタイトが生成する。この温度でも生成したハイドロキシアパタイトにも不純物が含まれている。

SPS を用いて得られたハイドロキシアパタイト結晶の大きさと生成温度との関係を調べた。Fig.6 に示した SEM 像は、670MPa の 500°C で生成したハイドロキシアパタイト結晶が 1 μm 以下であることを示している。600MPa で 600°C の条件で生成したハイドロキシアパタイト結晶は 2 μm 以下と大きくなっていることが Fig.7 によって示される。Fig.8 は 20MPa の圧力