

表1 チタン粉末のプラズマ放電加工条件

試料は直径 5mm、高さ 10mm

Sintering Temperature	Sintering Time	Sintering Pressure	Current Density	Current Voltage	Vacuum
570°C	10 min	25 MPa	750 A	2~3 V	3~4 Pa

表2 体液および擬似体液の無機イオン成分

	The ion concentrations (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Human blood	142.0	5.0	1.5	2.5	103.8	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0.5

表3 焼結体の気孔率、弾性係数、圧縮耐力、圧縮強度

	Compact by SPS	Compact with Annealing
Porosity (%)	28±1	25±2
Elastic Modulus (GPa)	7.9±0.7	10.7±1.2
Proof Strength (MPa)	112±9	350±19
Ultimate Strength (MPa)	112±9	588±169

表4 擬似体液に浸漬した試料の焼結後の重量に対する浸漬後の重量変化

		2 Weeks (%)	4 Weeks (%)
Compact by SPS	Non Treated	0.06±0.02	-0.05±0.03
	Chemical Treatment	2.69±0.03	2.56±0.01
Compact with Annealing	Non Treated	0.03±0.01	0.04±0.09
	Chemical Treatment	1.40±0.05	1.38±0.07

表5 チタン焼結体実表面の単位面積あたりの重量変化

参照データは、直径 3.3 mm、厚さ 1 mm のチタン板

	Mass Change (mg)		Mass Change per Apparent Surface Area (mg/mm ²)	
	2 Weeks	4 Weeks	2 Weeks	4 weeks
	Ti Disc	0.7±0.0	1.4±0.1	4 × 10 ⁻⁴
Compact by SPS	16.6±0.2	15.8±0.0	9 × 10 ⁻²	8 × 10 ⁻²
Compact with Annealing	8.8±0.3	8.6±0.4	5 × 10 ⁻²	5 × 10 ⁻²

表6 チタン多孔体を蒸留水に浸漬したときの重量変化

	Chemical Pretreatment (%)	Immersion in SBF (%)		Immersion in Distilled Water (%)	
		2 Weeks	4 Weeks	2 Weeks	4 Weeks
Compact by SPS	1.95±0.22	2.69 ±0.03	2.56 ±0.01	-0.32 ±0.02	-0.36 ±0.07
Compact with Annealing	1.60±0.03	1.40 ±0.05	1.38 ±0.07	-0.27 ±0.00	-0.32 ±0.01

表7 粒度の異なるチタン焼結体の気孔率、弾性係数、圧縮体力、圧縮強さ

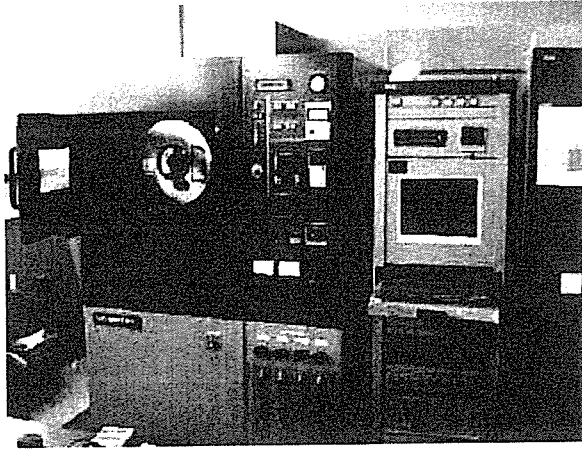
Particle size (μm)	45	100~125	212~250
Porosity (%)	22.9±0	27.4±0.6	28.0±0.7
Elastic modulus (GPa)	6.3±0.8	6.5±1.0	6.3±0.4
Proof strength (MPa)	121±0.6	127±23	118±4.5
Ultimate strength (MPa)	150±5.5	127±23	118±4.5

表8 疑似体液浸漬後のチタン焼結体の重量変化

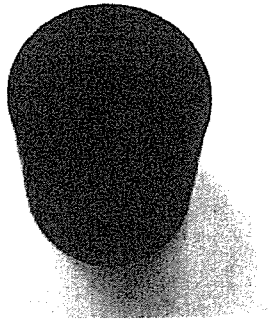
Ti	Mass Change (mg)	
	2 Weeks	4 Weeks
45μm	25.1±0.4	25.2±0.5
100~125μm	12.7±0.3	12.9±1.4
212~250μm	4.3±0.4	3.6±0.6

表9 疑似体液浸漬による単位面積あたりの重量変化

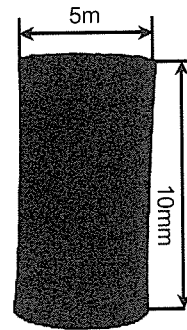
Ti	Mass Change per Surface Area (μg/mm ²)	
	2 Weeks	4 Weeks
Disc	0.4	0.7
45μm	1.30	1.30
100~125μm	1.64	1.66
212~250μm	1.15	0.96



(a)



(b)



(c)

図1 (a) 焼結に用いたプラズマ放電加工機、(b) 焼結用炭素ダイス
(c) 焼結後の多孔体試料

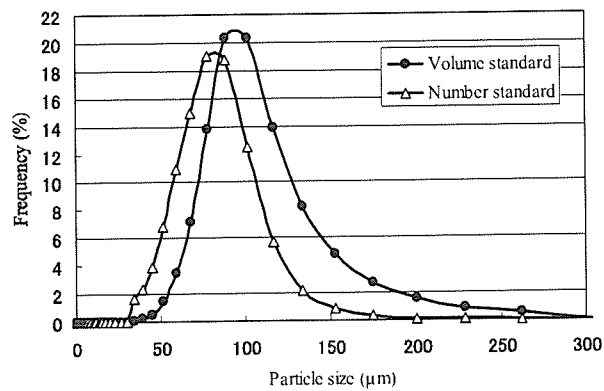
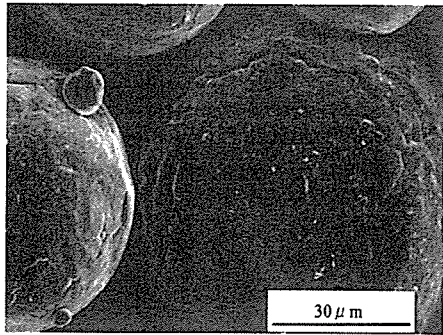
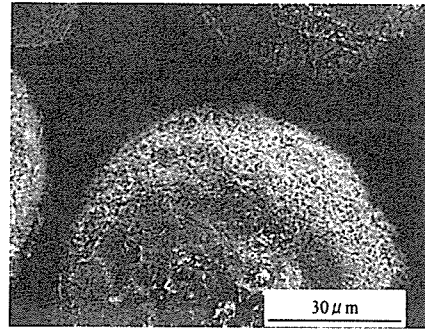


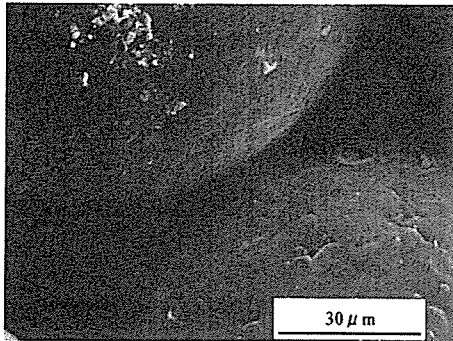
図2 市販直径 150μm アンダーのチタン粉末の粒度分布



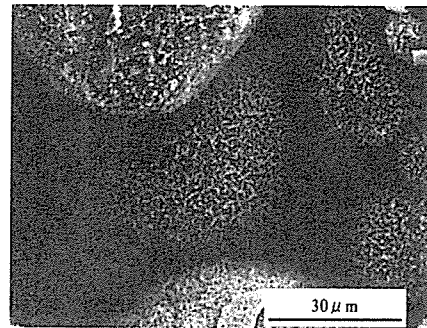
a) Sintered compact、 2 week



b) Sintered compact using alkali treatment、 2 week

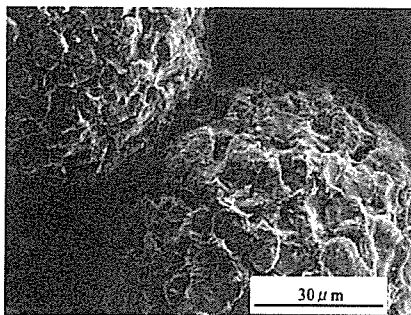


c) Sintered compact、 4 week

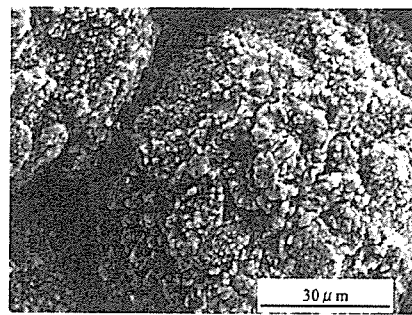


d) Sintered compact using alkali treatment、 4 week

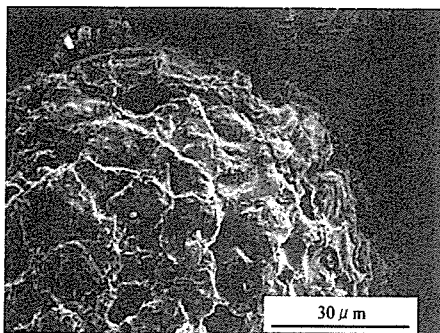
図3 チタン焼結体を疑似体液に浸漬した後のチタン粒子表面のSEM写真



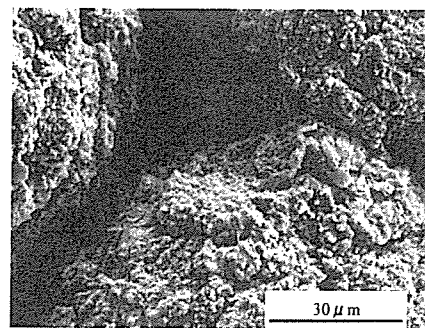
a) Annealed of sintered compact、 2 weeks



b) Annealed of sintered compact using alkali treatment
2 weeks



c) Annealed of sintered compact、 4 weeks



d) Annealed of sintered compact using alkali treatment 4 weeks

図4 焼鈍したチタン多孔体を疑似体液に浸漬した後の粒子表面のSEM写真

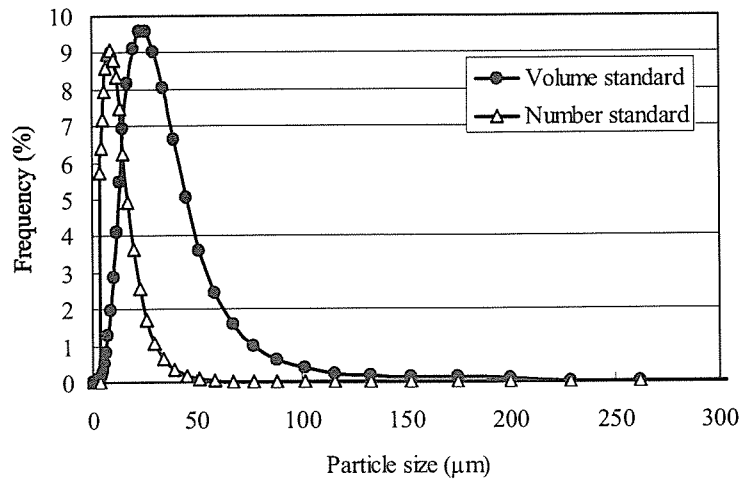


図5 市販 45 μm アンダーのチタン粉末の粒度

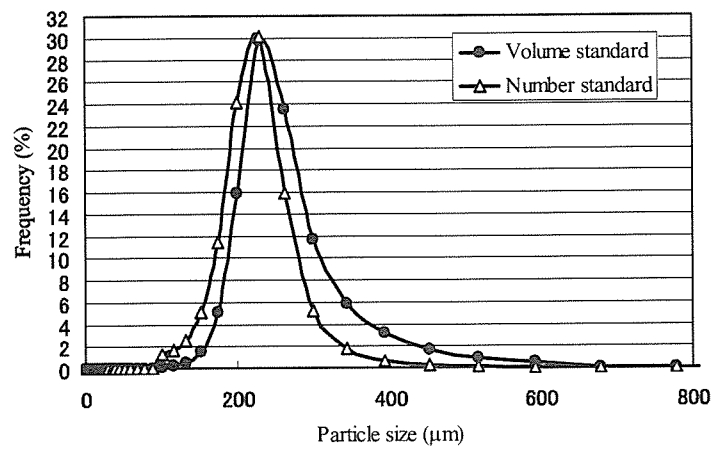


図6 市販 250 μm アンダーのチタン粉末の粒度

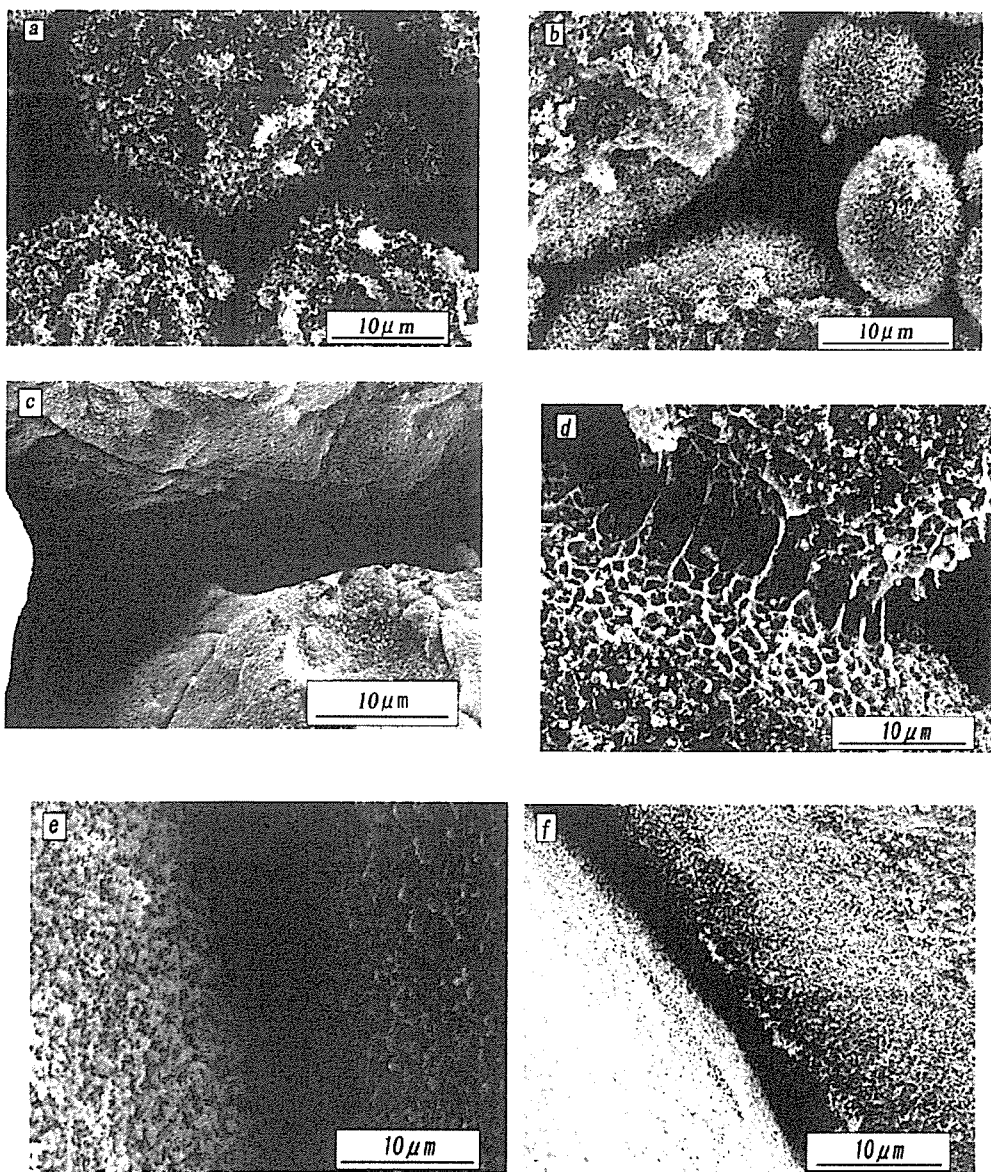


図7 疑似体液に2週、4週浸漬したチタン多孔体の粒子表面のSEM写真
 (a)、(b)は45 μm のチタン粒子：(c)、(d)は150 μm のチタン粒子：
 (e)、(f)は250 μm のチタン粒子

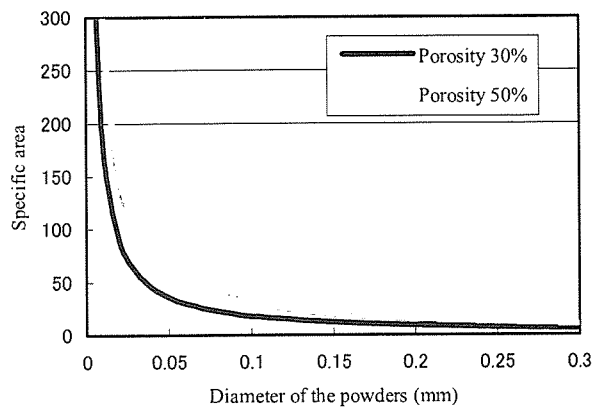


図8 円柱状試料の実表面積と粒度との関係についての計算結果

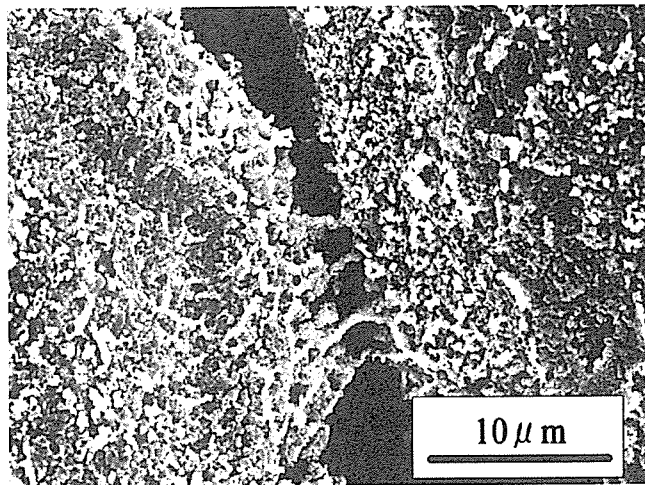


図9 化学処理したチタン多孔体を疑似体液に4週浸漬した後の粒子表面のSEM写真

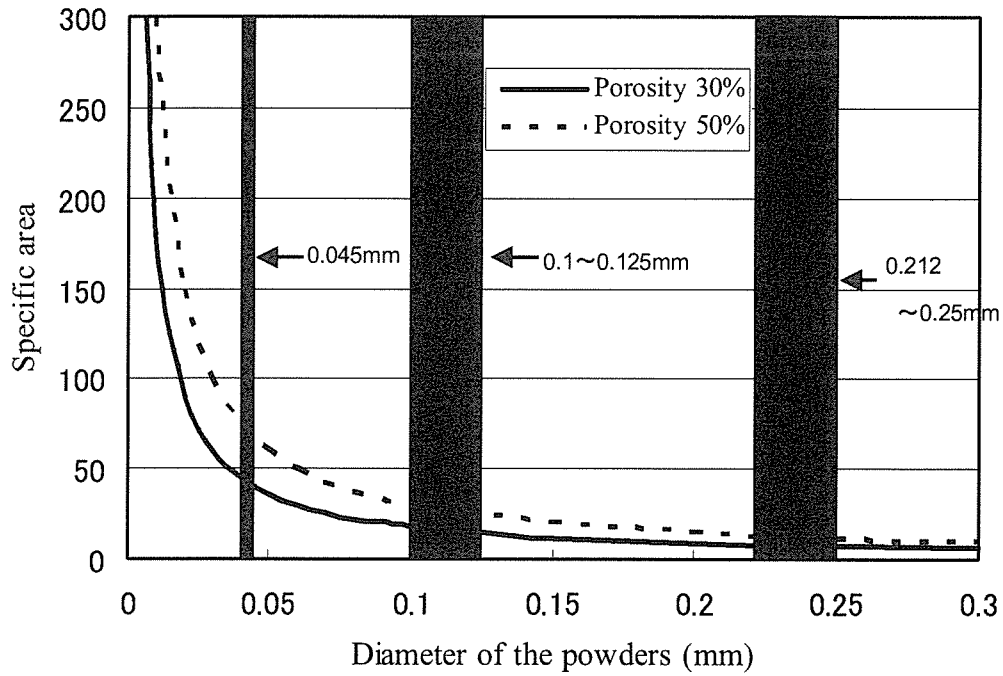


図 10 粒径と焼結体の実表面積との関係についての計算結果

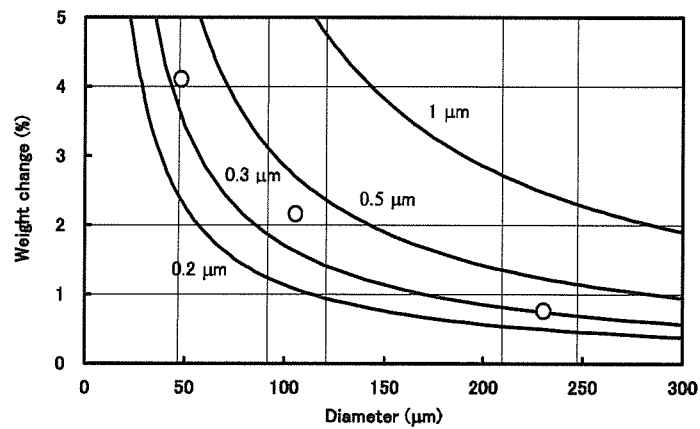


図 11 各試料の表面皮膜の厚さについての計算値と実験値の比較

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ナノアパタイトの全身動態検索に関する研究

分担研究者 石川邦夫

九州大学大学院歯学研究院教授

研究要旨 本研究においては生体骨の無機主成分がナノアパタイトであることに着目し、現在骨補填材として用いられている焼結体アパタイトとナノアパタイトの生体内挙動に関する差異を検討することを目的とした。

生体骨の無機主成分であるナノサイズ炭酸アパタイトは生体内の中性環境においては熱力学的最安定相であるが、焼結等で用いられる高温領域においては熱力学的に不安定であるため通常セラミックスの調製として用いられる焼結法では調製できない。

生体内の環境では炭酸アパタイトが熱力学的最安定相であることから考えると熱力学的不安定相を中間体として溶解-析出反応を利用すれば、炭酸アパタイトブロックが調製できる。中間体としては無脊椎動物の硬組織である炭酸カルシウムを選択した。しかしながら、炭酸カルシウム圧粉体をリン酸塩水溶液に浸漬したところ炭酸カルシウムが崩壊して形態を保持できないことがわかった。そこで、まず炭酸カルシウムブロックの調整法を検討した。具体的には水酸化カルシウムの気硬性を利用して炭酸カルシウムブロックを調整することを本年度の研究目標とした。水酸化カルシウムを一軸成形し、二酸化炭素に暴露すると炭酸カルシウムブロックが形成された。炭酸カルシウムの変態は最も熱力学的安定相であるカルサイトであった。水酸化カルシウムから炭酸カルシウムへの組成変化は二段階反応で進行し、水酸化カルシウム表面の炭酸化に伴う粒子間の結合が炭酸カルシウムブロック形成のメカニズムであることがわかった。得られた炭酸カルシウムブロックは水溶液に浸漬しても崩れず形態を保てるため、炭酸カルシウムブロックを中間体として炭酸アパタイトブロックが調製できる可能性が高いと判断された。試薬として販売されているカルサイトの結晶子が 834 nm であったが、得られたカルサイトの結晶子は 262-306 nm であり極めて結晶子が小さいカルサイトがブロック状に成形できるため、当該炭酸カルシウムブロックを前駆体として用いることによりナノサイズ結晶子炭酸アパタイトが形成される可能性が高いと結論した。

A. 研究目的

超高齢社会の到来に伴い、骨疾患が増加している。骨欠損治療における第一選択は自家骨移植であるが、1) 自家骨採取に必要な健全部位への二次的手術のコストおよび倫理的問題、2) 健全部位への侵襲に

伴う疾患発生リスク、3) 採取可能骨の量的制限、4) 採取可能骨の形態的制限が指摘されている。これらの自家骨採取に付随する問題は自家骨と同等の機能を有する人工骨補填材が開発されれば全て解決されるが、現時点において生体骨と同様の機能を示

す人工骨補填材は開発されていない。

現時点において人工骨補填材の主流は生体骨の無機主成分を模倣した焼結体アパタイトである。生体骨と同成分、同じ結晶子サイズのアパタイトが好ましいと予測されるが、アパタイト粉末は生体内で結晶性炎症を惹起するため、粉末では骨補填材として使用できず、ブロックのアパタイトに加工する必要がある。そのため、化学合成したアパタイト粉末を焼結し、ブロック状や顆粒状とした人工骨補填材が臨床応用されている。

現在、骨補填材として臨床応用されているアパタイト焼結体は優れた組織親和性と骨伝導性（骨が繊維性結合組織の介在なしに材料と結合する性質）を示すが、自家骨とは異なり生体骨とは置換されない。また、骨形成能に関しても生体骨と比較すると限定的であるため骨再建術においては自家骨移植が第一選択とされている。

骨疾患が寝たきりの第二要因（女性に限定した場合は第一要因、また骨疾患は認知症の第一要因）である現状から判断しても自家骨移植に変わりうる人工骨補填材の開発は極めて大きな問題であるが、なぜアパタイトが骨伝導性（骨組織が存在する部位にインプラントした場合に透過型電子顕微鏡レベルでも繊維性結合組織の介在なしに材料と母床骨が直接結合する性質）を示すかという基本的な事象を含めても研究は行われていない。

生体骨とアパタイト焼結体の間には骨成長因子(BMP: Bone Morphogenic protein)の存在の有無、コラーゲンの存在の有無、微量元素の存在の有無などさまざまな相違があるが、大きな相違点の一つはアパタイトの結晶性（結晶子サイズ）である。例えば通常のコロンサイズのアパタイトの等電点はマイナスであるが、ナノサイズのアパタイトの等電点はプラスになることが報告されている。アパタイトの骨伝導性には蛋白の吸着等が関与していることが予測されており生体骨に近いナノアパタイトの生体内挙動の解明は自家骨に変わりうる骨置換材創製のみならず、骨格系を形成している骨の形成機序の観点からも極めて重要である。

本研究においては生体骨と同じナノサイズ炭酸アパタイトを調製し、その生体内挙動を実験動物を用いて検討することにある。また、生体内挙動をより詳細に解明するために骨リモデリングに重要な役割

を果たしている骨芽細胞、破骨細胞を用いて挙動を検討する。

本年度は3年計画の1年目としてナノサイズ結晶子炭酸アパタイトの調製に必要な前駆体である炭酸カルシウムブロックの調製方法の確立と反応メカニズムの解析を行った。

B. 研究方法

炭酸アパタイト調製において前駆体となる炭酸カルシウムブロックは水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露することにより、調製した。

B-1 水酸化カルシウム圧粉体の調製

試薬グレードの水酸化カルシウム (Ca(OH)₂; ナカライテスク、京都) を本実験に使用した。0.2 gの水酸化カルシウム粉末をステンレス製金型に入れ、油圧プレスを用いて1-5 MPaで一軸加圧した。試料サイズは直径が10 mm、厚さが1-3 mmとなるように調製した。同様な手法にて直径6 mm、高さ11-13 mmの試料も調製した。

B-2 水酸化カルシウム圧粉体の炭酸化

水酸化カルシウム圧粉体を炭酸化を目的として二酸化炭素を充填した反応容器に静置し、室温で1-72時間反応させた。反応容器の容量は約5Lであり毎分0.15-0.20Lの二酸化炭素を供給し、過剰の二酸化炭素は排出口から排出した。

B-3 機械的強さの測定

試料の機械的強さは万能試験機 (IS5000、島津、京都) を用い、クロスヘッドスピードを毎分1 mmとして間接引張強さ(DTS: diametral tensile strength)および圧縮強さ(CS: compressive strength)測定により評価した。試料数は1条件につき、最低5個とした。

B-4 粉末 X 線回折分析

試料は粉末とし、粉末 X 線回折装置(RINT 2500V、

理学、東京)を用いて管電圧 40 kV、管電流 100 mA の条件で、CuK α モノクロ条件で 10 to 60° 2 θ をスキャン速度 毎分 2°にて測定した。

なお、定量化には水酸化カルシウムの (001, $d=4.905 \text{ \AA}$) おおび炭酸カルシウムの(0-22, $d=2.095 \text{ \AA}$) ピークを用いた。

B-5 微細構造検索

試料表面および内部の微細構造は金コーティングの後、走査型電子顕微鏡 (JSM 5400LV、JEOL、東京) にて加速電圧 15 kV の条件で観察した。

B-6 気孔率測定

見かけ密度は試料の体積および重量測定から計算した。また、気孔率は炭酸カルシウムの変態の一種であるカルサイトの密度(2.711 g/cm³)と見かけ密度から計算した。

B-7 崩壊性

試料の崩壊性に関しては当該試料を蒸留水中に浸漬することにより崩壊の有無を目視で検討した。

C. 研究結果

水酸化カルシウムを72時間二酸化炭素に暴露しても巨視的な変化は認められなかった。図1は成形圧 1MPa で調整した水酸化カルシウム圧粉体の二酸化炭素暴露前(a, b)、二酸化炭素に4時間暴露した試料(c, d) および二酸化炭素に72時間暴露した試料の表面(a, c, e)および断面(b, d, f)のSEM写真である。このように SEM レベルにおいても二酸化炭素暴露による結晶形態の著名な変化は認められなかった。

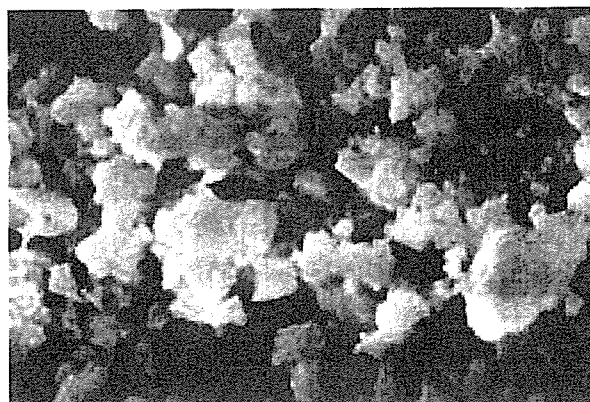


図1 a 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体の表面のSEM像



図1 b 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体の断面のSEM像

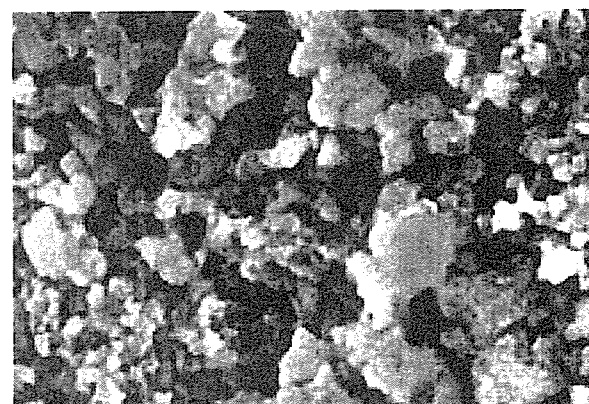


図1 c 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体を4時間二酸化炭素暴露した試料表面のSEM像

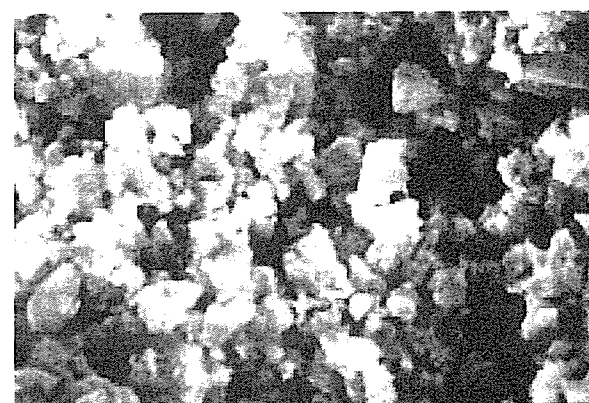


図1d 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体を 4 時間二酸化炭素暴露した試料断面の SEM 像

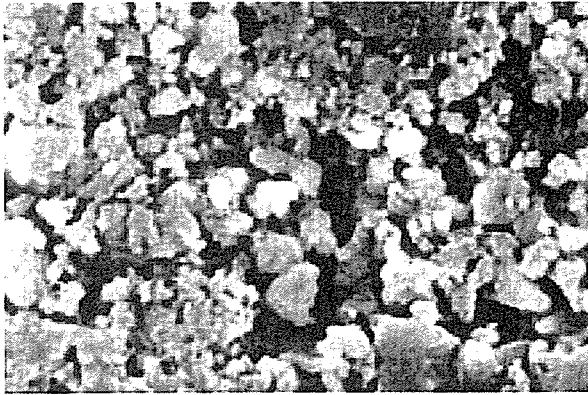


図1e 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体を 72 時間二酸化炭素暴露した試料表面の SEM 像

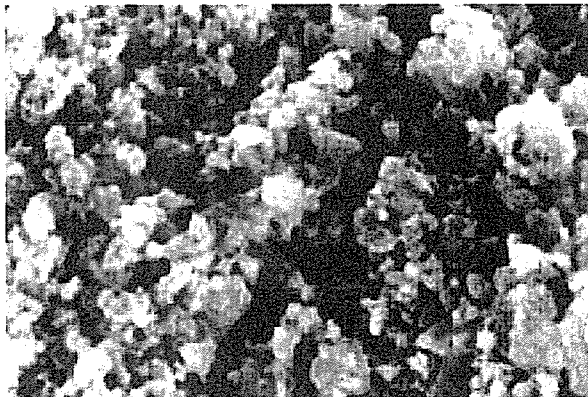


図1f 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体を 72 時間二酸化炭素暴露した試料断面の SEM 像

図2は水酸化カルシウム成形圧（1 - 5 MPa）が試料の形態に及ぼす結果を調べた結果である。成形圧が増大するに従い、気孔が少なく、かつ、小さくなっていることがわかる。

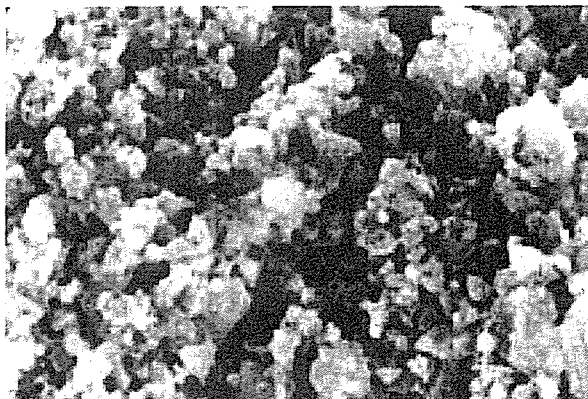


図2a 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉

体を 72 時間二酸化炭素暴露した試料断面の SEM 像（図1dと同じ）

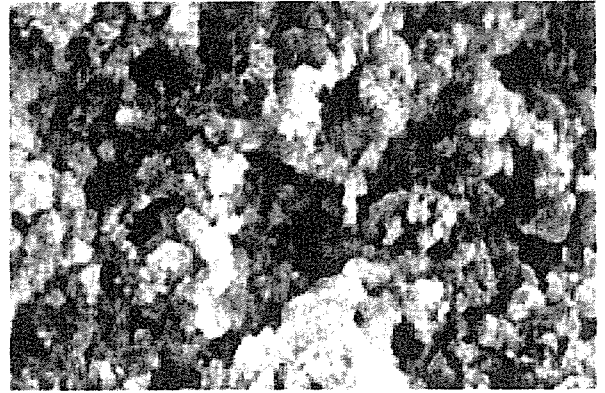


図2b 2MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体を 72 時間二酸化炭素暴露した試料断面の SEM 像

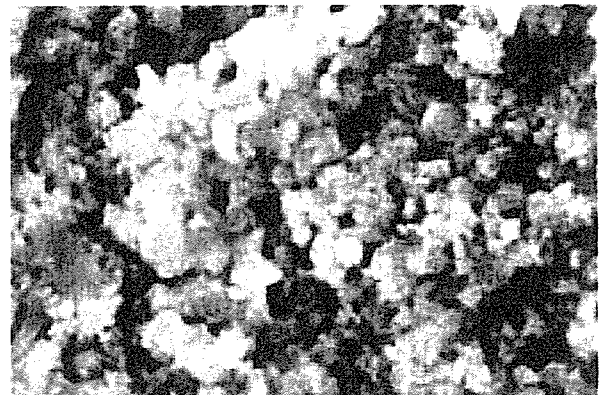


図2c 3MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体を 72 時間二酸化炭素暴露した試料断面の SEM 像

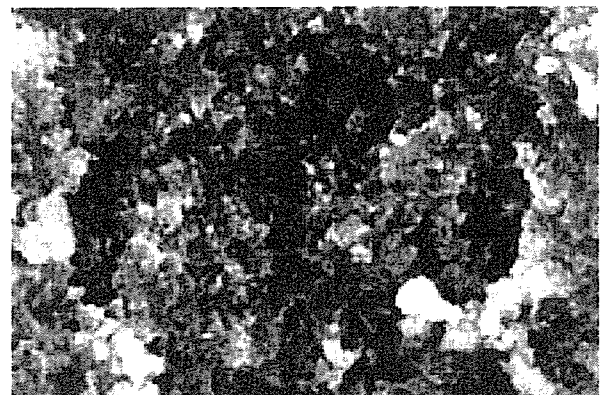


図2d 5MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体を 72 時間二酸化炭素暴露した試料断面の SEM 像

表1は水酸化カルシウム成形圧が試料の気孔率に及ぼす影響を検討した結果である。成形圧の増大に伴い、気孔率が低下することがわかった。

成形圧 (MPa)	気孔率 (%)
1	48.1±1.0
2	42.2±0.6
3	41.5±1.6
5	36.8±0.4

図3は2MPaの成形圧で圧粉した試料を二酸化炭素に72時間まで暴露した時の組成変化を粉末X線回折装置にて解析した結果をまとめたものである。SEMレベルでの著名な結晶形態の変化は認められなかったが、水酸化カルシウムが炭酸カルシウムに直接的に組成変換されていることがわかる。炭酸カルシウムの変態は炭酸カルシウムの中で最も安定相であるカルサイトであることもわかった。

カルサイトの粉末X線回折ピークは薬品として市販されているカルサイトと比較してブロードであった。すなわち、水酸化カルシウム圧粉体の二酸化炭素暴露により形成されたカルサイトは結晶子が小さいことを示す。市販のカルサイトの結晶子は834nmであり、水酸化カルシウムの二酸化炭素暴露で調整されたカルサイトの結晶子は262-306nmであった。

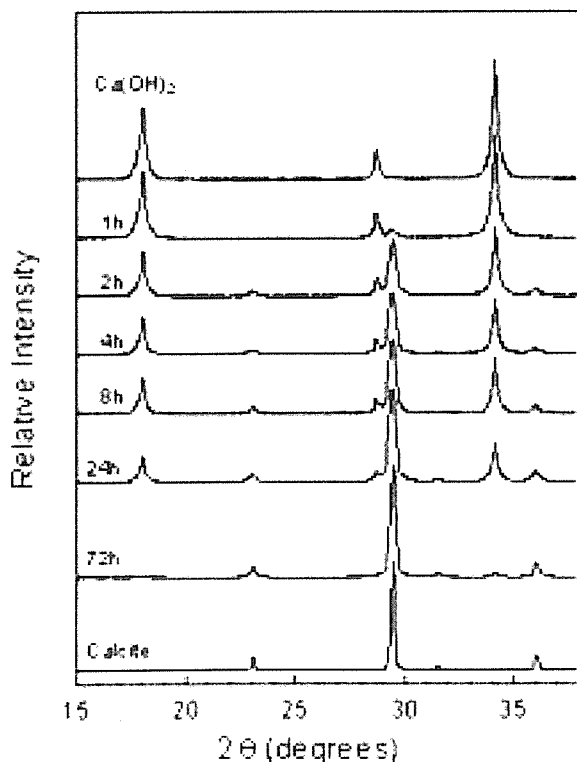


図3 2MPaの成形圧で圧粉した水酸化カル

シウム圧粉体を二酸化炭素に暴露した試料の粉末X線回折パターン

図4は異なる成形圧で調整した水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露した試料の組成変化を速度論的に解析する目的で水酸化カルシウムとカルサイトの定量を行った結果である。図4に示すように水酸化カルシウムから炭酸カルシウムへの組成変換反応は二段階で起きていることがわかる。第一段階では急速な反応が進行し、2-4時間で約50%のカルサイトが生成される。第二段階の反応は第一段階と比較して著しく速度が遅い。そのために反応終了に要する時間は成形圧に大きな影響を受けることなく一定であった。

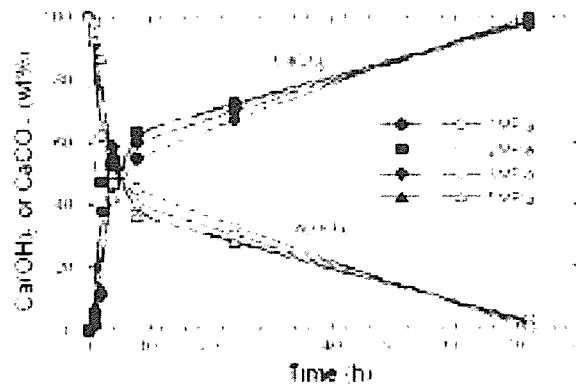


図4 1-5MPaの成形圧で圧粉した水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露した試料の組成変化

この二段階反応はカルサイトの形成量を反応時間の平方に対してプロットすると、より明らかになる。2-4時間から72時間にかけて、カルサイトの形成反応が反応時間の平方根に対して直線的に増大していることがわかった。このことから第二段階の炭酸化は結晶内における炭酸イオンの拡散律速に依存していることが推察された。

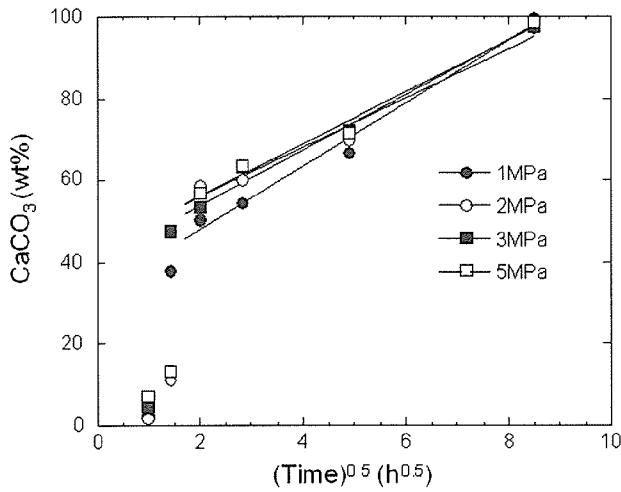


図5 1-5MPaの成形圧で圧粉した水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露した試料の組成と反応時間の平方の関係

図6は成形圧が1-5MPaの場合における試料の機械的強さを間接引張強さを指標に二酸化炭素暴露時間に対してプロットしたものである。成形圧に関わらず24時間までは機械的強さが増大し、その後はほぼ一定であることがわかる。一方、成形圧に関しては、成形圧が大きいほど機械的強さの大きい試料が得られることがわかった。表1および図6の結果から判断して、気孔率の小ささが機械的強さ発現に寄与していると推察できる。

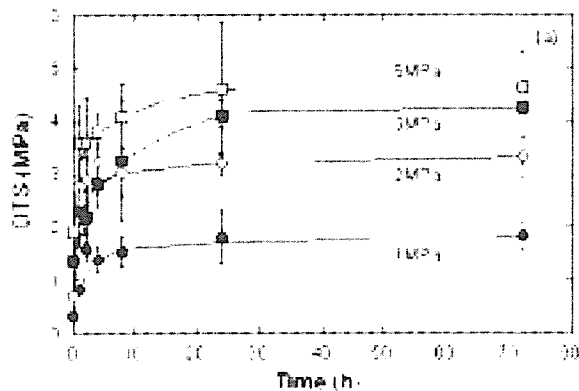


図6 水酸化カルシウム圧粉体の機械的強さ(間接引張強さ)に及ぼす二酸化炭素暴露時間の影響。成形圧は1-5MPa

2段階反応におけるカルサイト形成と試料の機械的強さの関係を理解する際に試料の間接引張強さを炭酸カルシウム(カルサイト)形成量に対してプロットした図7は有用である。図7においては反応

が2段階に分かれることが明瞭にわかる。第一段階においては約10%の炭酸カルシウム(カルサイト)の形成に伴い急激に機械的強さが発現される。急激な機械的強さの発現以降は炭酸カルシウム形成量が50%になるまで炭酸カルシウムが形成されても機械的強さの増大は認められない。第二段階においてはもう一度機械的強さの増大が観察される。絶対的な機械的強さは水酸化カルシウムの成形圧に依存するが、2段階反応の進み方や時間的な要素に関しては成形圧に関わらず同様な挙動を示した。

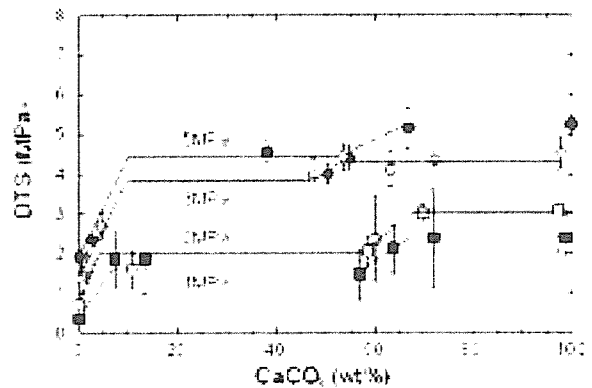


図7 炭酸カルシウム形成量と試料の機械的強さ(間接引張強さ)の関係。成形圧1-5MPa

D. 考察

本研究の結果は、生体骨の無機主成分であるナノサイズ炭酸アパタイトブロックの前駆体として水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露することにより262-306nmであり極めて結晶子が小さいカルサイトがブロック上に成形できたことがわかった。

水酸化カルシウムからナノ結晶子炭酸カルシウム(カルサイト)の形成メカニズムに関しては必ずしも完全には解明されていないが図8のように進行すると考えられる。

水酸化カルシウム圧粉体が二酸化炭素に暴露された場合、水酸化カルシウム粒子の表面が炭酸化され炭酸カルシウム(カルサイト)が形成される。(図8(a), (b))この初期プロセスは水酸化カルシウム粒子表面と二酸化炭素の反応であるため迅速に進行する。この水酸化カルシウム粒子表面に形成された炭酸カルシウムが近接する水酸化カルシウム粒子表面に形成された炭酸カルシウムと結合し、初期の機械的強

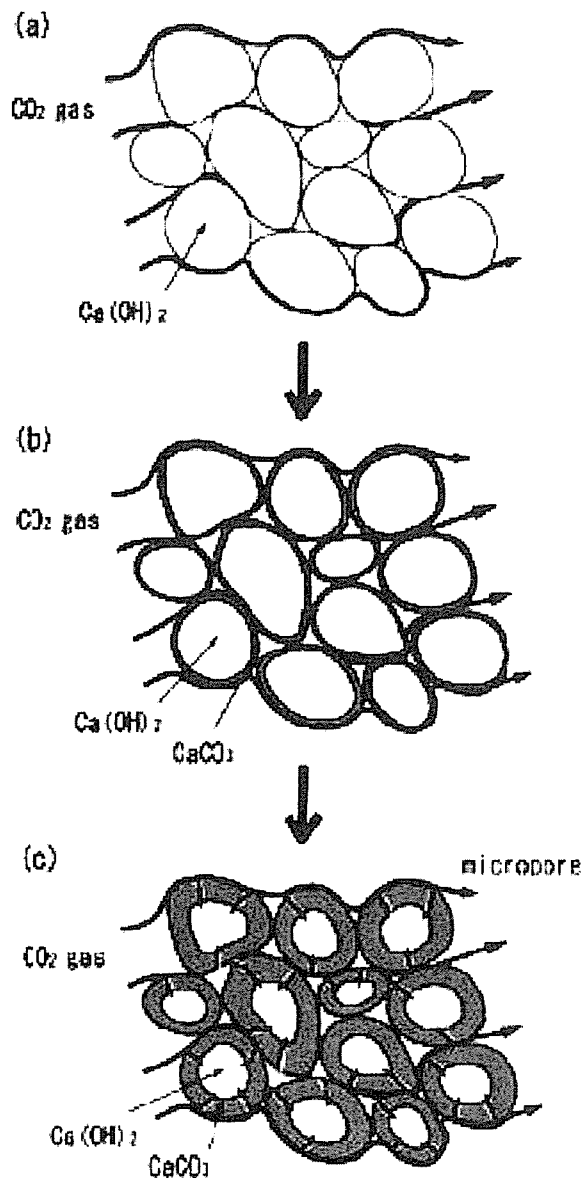


図8 水酸化カルシウム圧粉体の二酸化炭素暴露による硬化反応の概念図

さの急激な発現の原因となる (図 8(b))。

第二段階では二酸化炭素の拡散により水酸化カルシウム粒子の炭酸化が更に進行する。しかしながら、この段階は表面に形成された炭酸カルシウム層への二酸化炭素の拡散によって進行するため、第一段階に比較して速度が著明に遅い (図 8(c))。粒子表層下の炭酸化の進行は一定期間の間、試料の機械的強さには影響を及ぼさない。これは試料の機械的強さが粒子表面の炭酸カルシウム形成に伴う粒子の固定に起因するためであり、粒子表層下の組成要因が機械的強さに及ぼす影響が限定的であるからである。しかしながら、水酸化カルシウム粒子と炭酸カルシウム粒子の機械的性質には差異があると考えられる。

これは水酸化カルシウム粒子の組成が約 50% 以上炭酸カルシウム組成になった段階で機械的強さの増大が認められることによって示唆される。

炭酸カルシウム圧粉体は水溶液中に浸漬すると形態を保てず崩壊する。したがって、炭酸アパタイトの熱力学的安定性を利用して炭酸アパタイトブロックは調製できず、炭酸アパタイト粉末となる。一方、水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露することにより形成された炭酸カルシウムブロックは水溶液中に浸漬しても崩れることなく形態を保持できる。本研究で得られた成果をベースに炭酸カルシウムを中間体としたナノサイズ結晶子炭酸アパタイトの創製が期待される。

また、炭酸カルシウムは無脊椎動物の骨格組成であり、それ自体が骨補填材として機能されると考えられる。したがって、ナノ結晶子を示す炭酸カルシウム (カルサイト) ブロックの骨補填材としての有用性も検討の価値があると判断される。

E. 結論

水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露することにより結晶子サイズが 262–306 nm である炭酸カルシウムブロックを調製することができた。本法によって形成された炭酸カルシウムの変態はカルサイトであった。

水酸化カルシウムから炭酸カルシウムへの組成変化は二段階反応で進行し、水酸化カルシウム表面の炭酸化に伴う粒子間の結合が炭酸カルシウムブロック形成のメカニズムであることがわかった。得られた炭酸カルシウムブロックは水溶液に浸漬しても崩れず形態を保てるため、炭酸カルシウムブロックを中間体として炭酸アパタイトブロックが調製できる可能性が高いと判断された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Matsuya, X. Lin, K. Udoh, M. Nakagawa, R. Shimogoryo, Y. Terada, K. Ishikawa "Fabrication of Porous Low Crystalline Calcite Block by Carbonation of Calcium Hydroxide Compact" Journal of Materials Science: Materials in Medicine, submitted.
2. S. Matsuya, X. Lin, K. Udoh, M. Nakagawa, R. Shimogoryo, Y. Terada, K. Ishikawa "Effect of Molding pressure on Carbonation of Calcium Hydroxide Compact" Journal of Materials Science:

2. 学会発表

1. 竹内あかり、丸太道人、松家茂樹、石川邦夫: 水熱処理法による石膏硬化体からの炭酸アパタイトブロックの創製: 第28回日本バイオマテリアル学会(東京都千代田区 アルカディア市ヶ谷) 第28回日本バイオマテリアル学会予稿集 134 ページ, 2006.
2. 福田雅幸、宮本洋二、柏木了、中田憲、高野裕史、永井宏和、武知正晃、松家茂樹、石川邦夫: 低結晶性炭酸アパタイトの

顎骨再建への応用に関する基礎的研究 第4報: 皮下における生体内挙動第28回日本バイオマテリアル学会(東京都千代田区) 第28回日本バイオマテリアル学会予稿集 200 ページ, 2006.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案取得
無し

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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
バイオ応用に関する研究

分担研究者 戸塚 靖則 北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者 高師 則行 北海道大学大学院歯学研究科助手

研究要旨 一般に生体親和性が優れているとされている生体材料も微粒子の場合には生体親和性が異なることが臨床では認められている。しかし、これまで、どのような微粒子が、生体に影響を及ぼすかについては、まだ十分に検討されていない。今回われわれは、顎口腔領域で使用されることの多いチタン微粒子とバイオ応用を目標としているカーボンナノチューブなどの金属の生体親和性について、好中球を用いて検討を行った。金属微粒子を採血したヒト末梢血から分離した好中球と混和して好中球の細胞生存率、好中球から放出される乳酸脱水素酵素活性値、活性酸素産生量、サイトカイン産生量を測定した。その結果、すべてのサイズのニッケルと10 μ m未満の金属微粒子は細胞為害性が高く、10 μ m未満の微粒子に対して好中球は炎症反応を起こしていることが示唆された。また、チタンの針状と球状では針状の方が細胞為害性が高かった。以上より、微粒子の細胞為害性に関連する因子として、材質、サイズ、形状が考えられた。

A. 研究目的

今日の臨床において生体材料が治療に使用されているが、その際に化学的安定性や生体親和性が問題となる。チタンは顎口腔領域で使用される金属の中でもその表面に安定した不動態酸化被膜を作ることから、耐蝕性に優れた生体親和性の良い材料とされており、主にデンタルインプラントや骨接合用のミニプレートとして用いられている。しかし、チタンインプラント周囲の軟組織中にチタン微粒子の存在を報告した論文が多数あり、またチタンイオンが細胞機能を阻害するとの報告がある。したがって一般に生体親和性が優れているとされている生体材料も微粒子の場合には生体親和性が異なることが予想される。しかし、これまで、どのような微粒子が、生体に影響を及ぼすか、あるいは影響を及ぼす場合どのような因子が関連するかについては、まだ十分に検討されていない。今回われわれは、顎口腔領域で使用されることの多いチタン微粒子や他の金属微粒子の生体親和性について、および生体親和性に影響する因子について、好中球を用いて検討を行った。

B. 研究方法

チタン、鉄、ニッケル、二酸化チタン、アルミナ、シリカ、酸化鉄の粒子をナノからマイクロサイズのものを使用した。チタンについては針状および球状の形態のものを使用した。カーボンナノチューブ（CNT）およびカーボンナノロッド（CNR）は東北大学大学院工学研究科田路教授が開発したものをを用いた。ヒト好中球は健康人から採血したあと、通法に従い、6%ヒドロキシエチルデンプン加生食水と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 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートしたものを検体とし、以下の項目を測定した。

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生細胞数をカウントした。

活性酸素産生量の測定

チトクロームC還元法で、各検体をPMA（ホルボールミスチン酸アセテート）で刺激して二波長分光光度計を用い好中球から産生された活性酸素産生量を測定した。

サイトカインの測定

ELISA法により好中球から放出されたTNF- α の産生量を測定した。

C. 研究結果

細胞生存率

チタン，鉄と比較してニッケルと混和した好中球の細胞生存率は低い傾向が認められた。

コントロールおよび10 μm 以上の大きさのチタンと比較して、10 μm 以下のチタンやCNT、CNRと混和した好中球の細胞生存率は低い傾向が認められた。針状チタンは球状チタンと比較して好中球の細胞生存率は低い傾向が認められた。(図1, 2, 3)

活性酸素産生量

コントロールおよび10 μm 以上の大きさのチタンと比較して、10 μm 以下のチタンや他の材料と混和した好中球からの活性酸素産生量は高い傾向が認められた。

針状チタンは球状チタンと比較して好中球からの活性酸素産生量は高い傾向が認められた。

(図4, 5, 6)

サイトカイン放出量

コントロールおよび10 μm 以上の大きさのチタンと比較して、10 μm 以下のチタンや他の材料と混和した好中球からのTNF- α の放出量は高い傾向が認められた。針状チタンは球状チタンと比較して好中球からのTNF- α の放出量は高い傾向が認められた。(図7, 8, 9)

D. 考察

一般にヒト好中球は、種々の刺激に対しては炎症反応を起こし活性酸素やサイトカインを放出し、また貪食やアポトーシスを起こすことが知られている。そこで本研究ではヒト好中球の機能を用いて、微粒子の生体親和性や為害性について研究した。

今回用いた金属のうち、ニッケルはもっとも細胞為害性が高いとされている。本研究においてもニッケルと混和した好中球の細胞生存率は、サイズに関係なく低いことから、材料は生体親和性に影響する因子であると考えられた。

細胞生存率から、10 μm 未満の微粒子は細胞為害性が高く、活性酸素産生量、サイトカイン

放出量から10 μm 未満の微粒子に対して好中球は炎症反応を起こしていることが示唆された。これは好中球の大きさは約10 μm であり、この細胞の大きさよりも小さい微粒子に対しては、好中球が反応していることを示している。このことから微粒子のサイズは生体親和性に影響する因子であることが示唆された。

生体親和性が高いとされているチタンに置いて、針状と球状で比較すると、針状の方が細胞生存率が低く、活性酸素産生量、サイトカイン放出量ともに高いことから、同じ材料、サイズであっても形態による差が見られることから、微粒子の形態は生体親和性に影響する因子であることが示唆された。

CNT、CNRは好中球よりも小さく、単体では正常細胞に影響を与えることが考えられるため、バイオ応用を考える際には炎症を惹起させることを利用した応用か、生体に対して免疫を抑制するなどの工夫を行った後の応用が必要と考えられた。

E. 結論

微粒子の生体親和性および為害性は、材料、サイズ、形態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。

図1. 細胞生存率 (サイズによる比較)

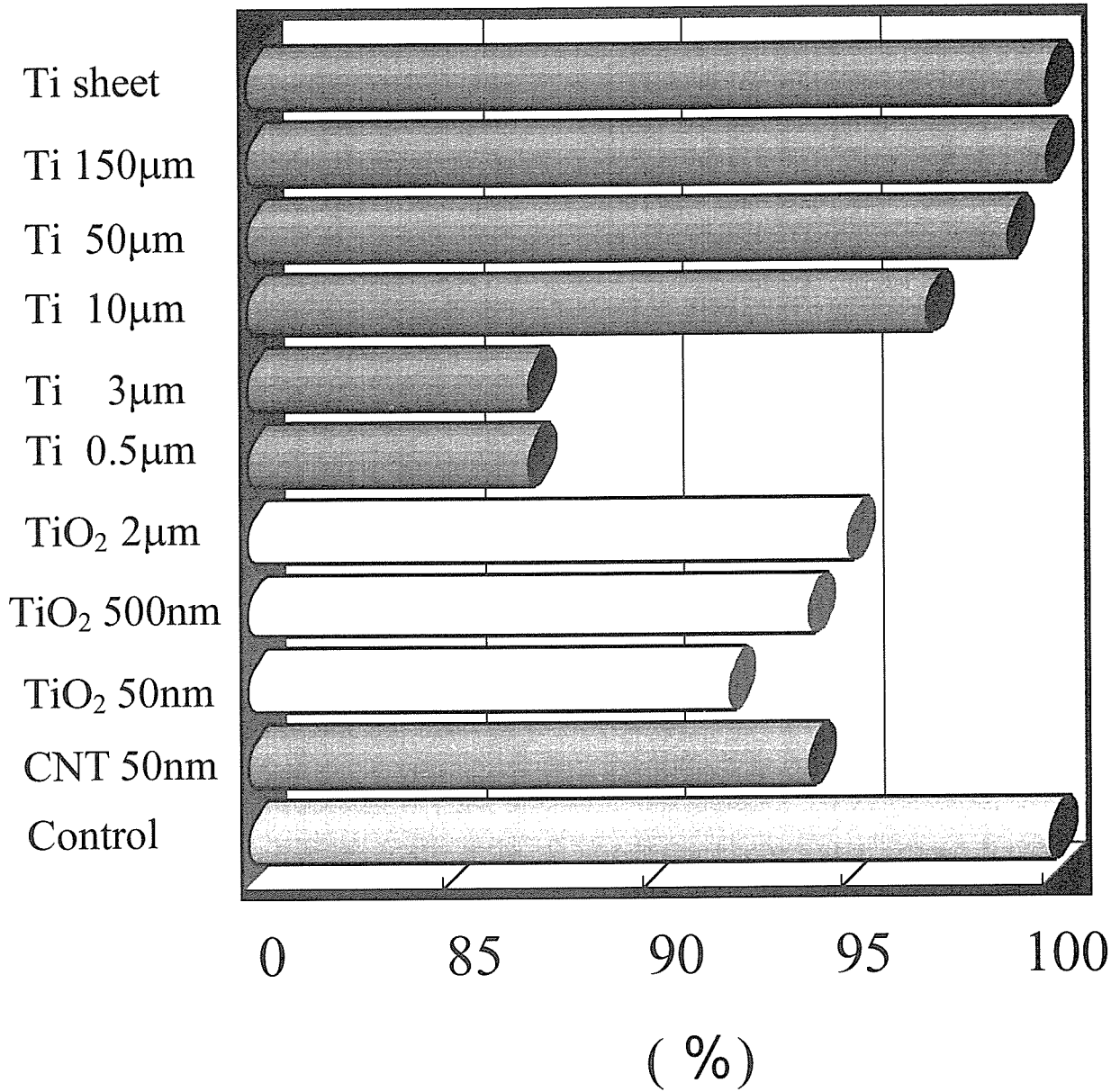


図2. 細胞生存率 (材料による比較)

