

予防歯科的な診断機器への応用例

北海道大学大学院歯学研究科

口腔健康科学講座

森田 学

Tel: 011-706-4254

Fax:011-706-4918

1. う蝕の診断

ナノ粒子を含む試薬を含嗽することで、ナノ粒子を歯の表面に吸着させることが可能になれば、以下のような応用が考えられる。

1)小窩・裂溝の深さの3次元的形態の推察

う蝕活動性に影響する因子として甘食、歯垢の質に加えて、歯の形態が大きく作用する。甘食、歯垢の質を調べる方法は多く研究されてきたが、歯の形態の把握について再現性のある方法は得られていない。

そこで、健全な歯質（ハイドロキシアパタイト）に吸着するナノ微粒子を用いて歯科用探針では到達できない小窩・裂溝の深部の3次元的な形態をシミュレートして、将来のう蝕活動性を推定する。

2)初期う蝕の診断・再石灰化

物理的な凹凸、歯表面の荷電状態を利用して初期う蝕病巣に特異的に吸着するナノ微粒子を開発する。また、フッ素と親和性の強い粒子を開発できたなら、従来よりも強力な再石灰化療法が可能となる。

2. 修復歯の内部の歯質診断

インレー直下、金属冠内部の二次う蝕の見落としをしばしば経験する。レントゲン写真から判定するのも困難である。そこで、ナノ粒子を含む試薬を内服後、血行を介して歯髄に到達した粒子を確認することが可能であれば、レントゲンでは分りにくい内部の歯質の状態の探知が可能になる。

3. 歯周病の診断

歯周病のスクリーニング検査方法として非観血的な手法の開発が望まれている。唾液の潜血や歯肉溝滲出液中の酵素活性を測定する方法など考案されてきたが、信頼性のある結果は得られていない。従って、依然として探針をポケット内に挿入する観血的方法に頼っているのが現状である。

そこで、歯周病原菌あるいはその内毒素に特異的に吸着するナノ粒子を開発する。その粒子を内服することで、非観血的に歯周ポケットの場所、その3次元的形状を推察することが可能となる。国策レベルでの喫緊の課題なので、商業ベースに乗せて広く展開したい研究である。

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発

(課題番号 : H18-化学-一般-006)

平成18年度冬期

第2回研究成果発表会

日時 : 平成19年3月1日~2日

場所 : 鳴門市「ルネッサンスリゾートナルト」

平成 18 年度研究組織

[主任研究者]

亘理 文夫 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 教授

[分担研究者]

田路 和幸 東北大学大学院環境科学研究科 教授
戸塚 靖則 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授
横山 敦朗 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 教授
北川 善政 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授
森田 学 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 教授
朝倉 清高 北海道大学触媒科学研究センター 教授
古月 文志 北海道大学大学院地球環境科学院 教授
大貫 惣明 北海道大学大学院工学研究科 教授
遠山 晴一 北海道大学大学院医学研究科 助教授
石川 邦夫 九州大学大学院歯学研究科 教授
岡崎 正之 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
浅岡 憲三 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

[研究協力者 (順不同)]

大森 守 東北大学 エネルギー安全科学国際研究センター 研究支援者
橋田 俊之 東北大学大学院工学研究科 教授
鈴木 邦明 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授
矢田 慶治 東北大学 名誉教授
奥山 文雄 名古屋工業大学 名誉教授
久保木 芳徳 北海道大学 名誉教授
芳賀 信幸 石巻専修大学大学院理工学研究科 教授
水野 峰男 (財) ファインセラミックスセンター 主席研究員
橋本 雅美 (財) ファインセラミックスセンター 副主任研究員
市野瀬 英喜 (独) 理化学研究所
植野 哲 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 助教授
米澤 徹 東京大学 大学院理学系研究科 助教授
林 靖彦 名古屋工業大学都市循環システム工学専攻 助手
佐藤 義倫 東北大学大学院環境科学研究科 助手
菫澤 崇 ブルカー・ダルトニクス株式会社
田中 信夫 名古屋大学大学院工学研究科 教授
坂口 紀史 北海道大学エネルギー変換マテリアル研究センター 助教授
小野寺 伸 北海道大学大学院医学研究科 運動機能再建医学分野 助手
北川 善政 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授

川浪 雅光	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	教授
菅谷 勉	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	助教授
八若 保孝	北海道大学大学院歯学研究科	口腔機能学講座	教授
宇尾 基弘	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	助教授
赤坂 司	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	助手
阿部薫明	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	助手
高師 則行	北海道大学大学院歯学研究科	口腔病態学講座	助手
野田坂佳伸	北海道大学大学院歯学研究科	中央研究部	助手
天雲 太一	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	客員歯科医師
青木 尚史	北海道大学大学院歯学研究科	口腔機能学講座	大学院生
朱 禹赫	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	大学院生
寺田 典子	北海道大学大学院歯学研究科	口腔病態学講座	大学院生
石川 紘佑	北海道大学大学院歯学研究科	口腔機能学講座	大学院生
阿部 大基	石巻専修大学大学院理工学研究科		大学院生

厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」 (H18-化学-一般-006)

第2回研究成果発表会プログラム

3月1日(木)

15:00~15:20

研究組織の紹介

研究全般について

「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」

北海道大学大学院歯学研究科生体理工学教室

亘理 文夫

15:20~15:33

マスマッピング用フラーレン誘導体の調製

北海道大学大学院歯学研究科

○赤坂 司、横山 敦郎、阿部 薫明、宇尾 基弘、亘理 文夫

東北大学大学院環境科学研究科

佐藤義倫、田路和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

葦澤 崇

15:40~15:53

実験室系 EXPEEM を用いた表面化学マッピング

○新美 大伸^{1,2}、嘉藤 誠³、川崎 貴博⁴、宮本 剛志¹、中村 元弘¹、和田 敬広¹、

鈴木 秀士¹、田旺帝^{1,2}、工藤 政都³、河原 直樹⁵、堂井 真⁵、塚本 勝美⁶、朝倉 清高¹

1.北海道大学 触媒化学研究センター、2.CREST-JST、3.日本電子、

4.北海道大学大学院 理学研究院、5.理学電機工業、6.リガク

16:00~16:13

多層カーボンナノチューブスカフォールドにおける骨芽細胞増殖因子の探索

東北大学大学院環境科学研究科

○佐藤義倫、土屋直実、田路和幸

北海道大学大学院歯学研究科

青木尚史、横山敦郎、亘理文夫

16:20~16:33

人工 ECM の幾何学:

マイクロ・スケールのトンネル(長軸ハニカム構造)が誘導する血管、骨、軟骨、神経

○久保木 芳徳^{1, 2)}、寺田 典子³⁾、石川 誠³⁾、北川 善政³⁾、

高山 満利子⁴⁾、野村 成規⁴⁾、鈴木 正弘⁴⁾、河野 牧子²⁾、

郁小兵²⁾、阿蘇 雄²⁾、伊藤 博²⁾、賀来 亨⁵⁾、宇尾 基弘⁶⁾、亘理 文夫⁶⁾

1) 北大名誉教授、2) 高研バイオサイエンス研究所、

3) 北大・歯・口腔病態学講座・口腔診断内科学教室、

4) (株)パイロットプレジジョン、

5) 北海道医療大学・歯・口腔病理学講座、

6) 北大・歯・口腔健康科学講座・生体理工学教室、

16:40~16:50 休憩

16:50~17:03

マイクロチタン粒子のキャラクタリゼーション

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

○浅岡 憲三

17:10~17:23

ヒップシミュレータ試験により発生したポリエチレン摩耗粉の形態解析

(財) ファインセラミックスセンター

○橋本雅美、水野峰男

17:30~17:43

チタンの表面炭化によるインプラントへの耐磨耗性付与

北海道大学大学院歯学研究科

○朱 禹赫、宇尾基弘、赤坂司、亘理文夫

17:50~18:03

人工関節磨耗粉により生じるオステオライシスにおける MIF (マクロファージ遊走阻止因子) の関与およびこれを標的とした治療戦略

北海道大学大学院医学研究科

○小野寺伸、遠山晴一、安田和則

18:10~18:40

特別講演

Interaction of technically relevant nanoparticles with cells and a small model organism

ドレスデン工科大学生体材料科学研究所

○Dr. Michael GELINSKY

18:50~19:10 休憩

19:10~19:23

歯根象牙質表面への bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) 塗布による硬組織形成と象牙質吸収

北海道大学大学院歯学研究科

○菅谷 勉、宮治 裕史、天雲 太一、本郷 哲也、川浪雅光

19:30~19:43

カチオン性ポリペプチドの脂質二分子膜透過とその観察

徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部

○植野 哲、嶋林 三郎

19:50~20:03

生体に投与した各種金属微粒子の体内動態のイメージング

北海道大学大学院歯学研究科

○阿部 薫明、赤坂 司、宇尾 基弘、久保木 芳徳、亘理 文夫

20:10~20:23

電界型 X 線の細胞照射効果—ナノ放射線医療へ向けて

名古屋工業大学名誉教授

○奥山 文雄

名古屋市立大学病院

中里 智治

20:30~20:43

ゾウリムシの接合過程に対するコバルトフェライトおよび酸化チタンの影響

石巻専修大学大学院理工学研究科

○阿部 大基、芳賀 信幸

20:50~21:03

カーボンナノ物質に対する生体反応—生体材料への応用と生体内分布—

北海道大学大学院歯学研究科

○横山 敦郎、青木 尚史、山本 悟、大堀 ことは、向後 隆男

野田坂 佳伸、赤坂 司、宇尾 基弘、亘理 文夫

東北大学大学院環境科学研究科

佐藤 義倫、田路 和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

菲澤 崇

21:10 終了

3月2日（金）

8:50~9:03

繊維状ナノ微粒子（アスベスト、BN ナノチューブ）の細胞毒性評価と

BN ナノチューブ／チタン複合材料の作製

北海道大学大学院歯学研究科

○宇尾基弘・阿部薫明・赤坂 司・森田 学・亘理文夫

東北大学大学院環境科学研究科

佐藤義倫・田路和幸

東北大学金属材料研究所

大森 守

9:10~9:23

ナノ材料の健康・環境影響評価のためのナノカーボンの成長とその物性

名古屋工業大学大学院工学研究科

○林靖彦、奥山文雄

9:30~9:43

コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした細胞培養担体の開発

○寺田典子¹、宇尾基弘²、久保木芳徳^{3,4}、北川善政¹、亘理文夫²

¹北大院・歯・口腔内科

²北大院・歯・理工

³高研バイオサイエンス研究所

⁴北大名誉教授

9:50~10:03

水分散ナノ粒子の製造と利用

東京大学大学院理学系研究科化学専攻

○米澤 徹

名古屋工業大学 大学院物質工学専攻

嶋志田圭吾、木下隆利

10:10~10:23

生体材料と細胞との界面相互作用

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

○岡崎 正之、平田伊佐雄

10:30~10:40 休憩

10:40~10:53

生体材料としてのカーボンナノチューブ-アルミナ複合材料の開発

東北大学大学院工学研究科

○大森 守、山本 剛、横溝 健児、橋田 俊之

東北大学金属材料研究所

木村 久道、大久保 昭

11:00~11:30

特別講演

ナノアパタイト粒子の象牙質再生療法への応用

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

○吉山 昌宏

11:40~11:53

イメージング質量分析を用いた生体組織評価 (2)

東北大学大学院環境科学研究科

○佐藤 義倫・田路 和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

葦澤 崇

12:00~12:10

全体討論、今後の方針

北海道大学大学院歯学研究科

亘理 文夫

マスマッピング用フラーレン誘導体の調製

北海道大学大学院歯学研究科

○赤坂 司、横山敦郎、阿部薫明、宇尾基弘、亘理文夫

東北大学大学院環境科学

佐藤義倫、田路和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

蕪澤 崇

1. 目的

体内での炭素系微粒子の検出は、金属類や蛋白質などと比べ困難であるのが現状である。炭素系ナノ微粒子の体内動態の可視化を目的とした。レーザーアブレーション/マスマスペクトル・マッピング用のフラーレンマーカータを目標化合物とし、細胞が有するレセプターや抗原に対する親和性を持ったフラーレン誘導体の合成を検討することとした。今回は、動物実験を行うため糖鎖-レクチン選択的相互作用を持つ糖鎖結合型水溶性フラーレンの合成を検討した。

2. 実験方法

[糖鎖結合型水溶性フラーレンの調製]

出発原料としてアセチル化したガラクトース (1.95g, 5mmol) をジクロロメタン (10ml) に溶解し、ブROMOエタノール (0.75ml, 6mmol) および $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3.55g, 25mmol) を加え、15分間反応させた。抽出後、シリカゲルカラム (ヘキサン：酢エチ=2:1) にて精製分離した。次に、末端のプロモ基をアジド化するため、得られたプロモエチル アセチル化ガラクトシド (1g) をDMF (10ml) に溶解し、 NaN_3 (214mg) を加え、65°C・2時間反応させた。抽出後、シリカゲルカラム (ヘキサン：酢エチ=1:1) にて精製した。

糖とフラーレンのカップリング反応のため、アジドエチル アセチル化ガラクトシド (58mg) およびC60 (100mg) をクロロベンゼン (50ml) に溶解し、10時間還流した。得られた混合物を濃縮後、シリカゲルカラム (①トルエン、②トルエン：酢エチ=10:1、③トルエン：酢エチ=3:1) にて精製した。

アセチル化ガラクトース 1 結合型C60 : (AcGal)1-C60 = 23mg

アセチル化ガラクトース 2 結合型C60 : (AcGal)2-C60 = 30mg

続いて、水溶化のためアセチル化ガラクトース 2 結合C60 (10mg) をトルエン (5ml) に溶解し、NaOH 2g/ H_2O 2ml およびTBAHを5滴加えた。1時間激しく攪拌後、エバポレーターにてトルエンを除き、50mlの H_2O を加え、さらに24時間反応を行った。後処理のため大過剰のメタノール (450ml) に反応混合物を加え、反応物を沈殿させた後、吸引ろ過 (PTFE, 0.2 μm) にてろ別した。メタノールにて3回洗浄後、60°Cにて乾燥し、得られた乾燥物を H_2O に加えて超音波を用いて分散させた。水に対しての不溶物を除くため、

ろ過 (0.2 μ m) を行い、その後、脱イオン水に対して5日間、透析 (Cut-off 500) により精製した。

3. 結果と考察

マスマッピングを行うために、既知の方法¹⁾にて合成を行った。合成戦略としては、①リガンドとしてフラレンとの間にスペーサーとして炭素数2のエチレン基を介し結合する、② C60との結合は後でマスマッピングするため、分裂しやすいように窒素を介した結合、③会合状態を避けるためC60に水酸基を多数導入し水溶性とすることとした。糖鎖とC60のカップリング反応では、ガラクトースを1つ結合したC60と2つ結合したC60が同時に合成できた。これらの化合物に水酸基を導入し水へ溶解したところ、一部が不溶性となった。これは、水酸基の導入率が分布を持つ反応であることより、不溶性の部分は水酸基の導入率が比較的低く (水酸基10-12個の導入率では水に不溶)、ミセルの様な状態になっていると考えられる。今後、水酸基の導入率を高めることにより水溶性フラレンの収量が向上すると考えられる。得られた水溶性C60分画は、マスマッピング (または動物試験) の検討に使用した。

表1 調製した糖鎖結合型フラレンの一覧

フラレン誘導体	略号	1回目マス試験	2回目マス試験
ガラクトース1結合型水溶性C60	Gal1- C60 (OH) n	○	
ガラクトース2結合型水溶性C60	Gal2- C60 (OH) n	○	○
グルコース1結合型水溶性C60	Glc1- C60 (OH) n	○	
グルコース2結合型水溶性C60	Glc2- C60 (OH) n	○	○
水溶性C60	C60 (OH) n		○

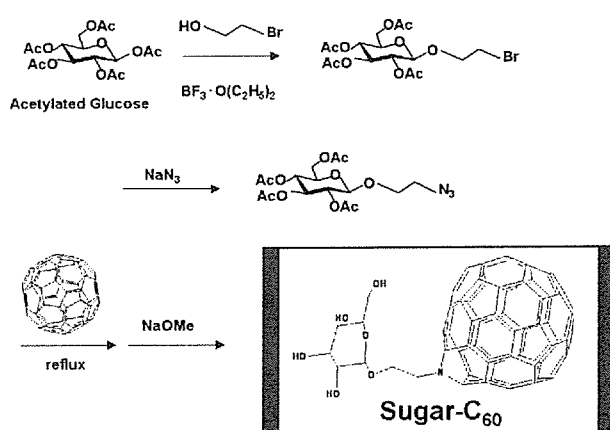


Fig1. 糖鎖結合型水溶性フラレンの合成スキーム

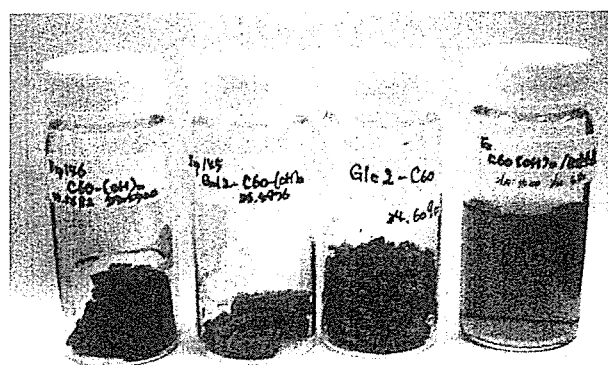


Fig2. 糖鎖結合型水溶性フラレンと水溶化物

Reference:

- (1) Haruhito Kato, et al. *Chem. Biodiv.*, 2, 1232 (2005).

実験室系 EXPEEM を用いた表面化学マッピング

1 北大触媒研セ, 2CREST JST, 3 日本電子, 4 北大院理, 5 理学電機工業, 6 リガク
○新美 大伸^{1,2}, 嘉藤 誠³, 川崎 貴博⁴, 宮本 剛志¹, 中村元弘¹, 和田敬広¹,
鈴木 秀士¹, 田 旺帝^{1,2}, 工藤 政都³, 河原 直樹⁵, 堂井 真⁵,
塚本 勝美⁶, 朝倉 清高¹

1. 研究の背景と目的

固体触媒を制御するためには表面化学過程のメカニズム解明が重要となる。そのためには表面に吸着する化学種の拡散や構造変化の様子を観察する化学イメージング法の開発が必要となる。そのような手法としてエネルギー選別型 X 線光放出電子顕微鏡 (EXPEEM) が挙げられる。この手法は、X 線を試料表面に照射することによって励起される内殻光電子をエネルギーアナライザで特定運動エネルギーの光電子のみを選別し、その像を投影する手法である。本手法は、像を得るために大強度の光源が必要なことから一般的に放射光が用いられる。しかし放射光施設は、実験時間を制限される問題点を持つ。そこで、我々は実験室系の X 線源を用いた EXPEEM の開発を行った。

2. 本装置の改良点

結像に寄与する光電子の量を増やすために次の二点の改良を行なっている。一つは X 線の強度を上げるため回転対陰極の X 線源[1]を用い、さらに人工多層膜の分光結晶によって集光と単色化を行い、スポットサイズが小さくなるように改良を行なっている。X 線源の出力は 400W (管電流: 25mA, 管電圧: 16 kV) であり、スポットサイズは $200 \times 300 \mu\text{m}^2$ である。また強度は同スポットサイズ辺り 10^{11} photons/s であり、第二世代放射光 (KEK-PF-BL-2A) と同程度の

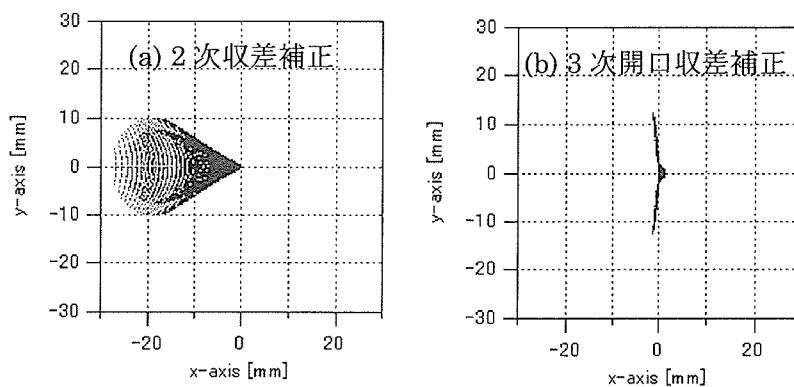


図 1 アナライザ出口スポットサイズ. (a)2 次収差補正を行なった場合. (b)3 次の開口収差補正まで行なった場合.

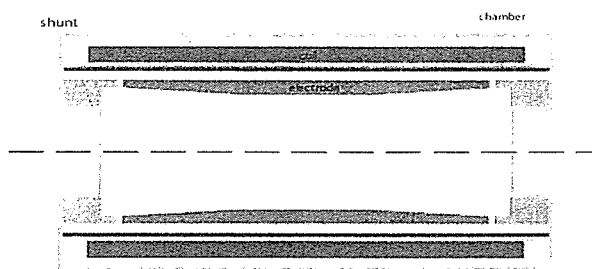


図 2 空芯コイル型多極子 Wien フィルタの概要図.

強度を持つ。もう一つは電子光学系での感度の損失を抑えるためにエネルギーアナライザの新規開発を行なっている。我々はレンズ調整の容易さを考慮し、直線光軸を持つ Wien フィルタを採用している。Wien フィルタの電子エネルギーの選別原理は、直交した電場と磁場をすることにより、 $E=v_e B$ を満たす電子のみを取り出すものである。またアナライザ出口での感度の損失を低減するために、Wien フィルタを多極子化し 3 次の開口収差までの補正[2]を可能にしている。二次収差補正を行なったものと 3 次開口収差補正まで行なったスポットの形状をそれぞれ図 1(a), (b) に示す。図 1(a)のほうが図 1(b)よりスポットサイズが十分に小さくなっていることがわかる。さらにエネルギー分散長を長くするためにフィルタサイズを大きくするために磁場を発生させる磁極に空芯コイルを用いた空芯コイル型多極子 Wien フィルタを開発した (図 2 参照) [3]。

3. 実験結果と考察

像の観察は超高真空下 (10^{-7} Pa) で行なった。光源は X 線源 (Al-K $_{\alpha}$ 線; 1486.7eV) を用いた。観察したサンプルは Si 基板の上にリソグラフィによって Au のアイランド ($50 \times 50 \text{ nm}^2$) を 75 nm 周期で作成したものをを用いている。図 3 は、 $E_k=0 \text{ eV}$ 付近の光電子を結像した 2 次電子像である。この図から Au アイランドが明るく見えることがわかる。これは、Si は表面が酸化膜で覆われているため、光電子が放出されにくいので、Au の領域が相対的に明るく見える。一方、図 4 は Au $4f_{7/2}$ のフィルタ像である。この像は内殻光電子の束縛エネルギーを反映した情報を反映しているため、Au アイランドのみが明るく見えることがわかる。

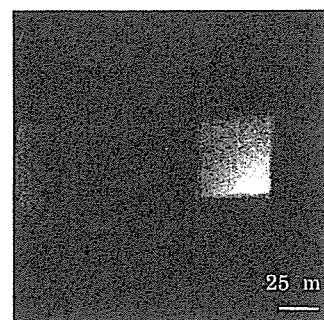


図 3 Au/Si の二次電子像

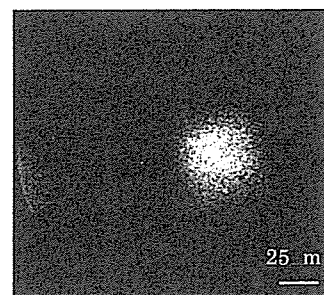


図 4 Au/Si の Au $4f_{7/2}$ フィルタ像

4. まとめと今後の方針

実験室系の多極子 Wien フィルタを用いたエネルギー選別型 X 線光電子放出顕微鏡としては、はじめて、内殻光電子のフィルタ像を取得することに成功した。現在、絶縁体試料の光電子イメージの取得を試みている。

参考文献

- [1] 石井他：表面科学 Vol.22, No.12 (2001) pp774-780
- [2] 嘉藤誠：博士論文，東京大学 (1997).
- [3] 特願 2005-093241 号

多層カーボンナノチューブスカフォールドにおける骨芽細胞増殖因子の探索

東北大学大学院環境科学研究科

○佐藤義倫、土屋直実、田路和幸

北海道大学大学院歯学研究科

青木尚史、横山敦郎、亘理文夫

1. 背景と目的

カーボンナノチューブの生体材料応用として細胞培養の足場（スカフォールド）に注目している。CNTsスカフォールド上で細胞増殖が促されることは報告されているが、どのような要素が細胞増殖に大きな影響を与えるかに関して言及したものは少ない。そこで、表面をカルボキシル基などの親水化処理を施した直径の異なる多層カーボンナノチューブ（multi-walled carbon nanotubes; CNTs; MWCNTs）（平均直径10 nm、200 nm、それぞれMW10、MW200とする）およびグラファイト（粒径7.5 μm）、スカフォールド作製時にナノチューブを堆積させるポリカーボネート（PC）および一般細胞培養に用いられるポリスチレン（PS）をスカフォールドとして細胞培養実験を行ない、スカフォールドの表面物理化学特性と細胞増殖の相関を評価した。

2. 実験

表面特性として、接触角、表面粗さ、タンパク質吸着量を測定した。接触角は脱イオン水またはPBS(-)に浸潤させた後に十分乾燥させたものについて行なった。表面粗さは表面粗さ測定装置を、タンパク質吸着物質はアルブミン、フィブロネクチン、ラミニンを使用し、吸着量はBCAキットにより定量した。細胞培養は作製したスカフォールド上に骨芽細胞を播取し、3日および7日間の培養を行った。規定日数経過後に細胞を固定化し、SEMにより細胞を観察した後、細胞数を測定した。

3. 結果および考察

サンプル形状に大きく影響する表面粗さは、カーボン材料がPS、PCと比較すると非常に大きいことが確認できた。表面性状に影響する接触角はPS、PCと比較してカーボン材料では小さく、細胞接着において重要となるタンパク質吸着量は共に高い値を示した。これはMWCNTsの作り出す網目状構造の中にタンパク質が浸入して、より多くのタンパク質を吸着したものと考える。MW10、MW200スカフォールドでは、3日後の細胞増殖は同等であったが、7日後の細胞増殖においては、MW10スカフォールドの方が細胞増殖を促した。カルボキシル基で化学修飾されているMW10、MW200、グラファイトはすべて同程度の負電荷を持っていることから、差が現れた表面粗さが骨芽細胞増殖因子の1つであることが示唆された。

人工ECMの幾何学：

マイクロ・スケールのトンネル（長軸ハニカム構造）が誘導する血管、骨、軟骨、
ならびに神経

- 1) 北大名誉教授、2) 高研バイオサイエンス研究所、
- 3) 北大・歯・口腔病態学講座・口腔診断内科学教室、
- 4) (株)パイロットプレシジョン、
- 5) 北海道医療大学・歯・口腔病理学講座、
- 6) 北大・歯・口腔健康科学講座・生体理工学教室、

久保木芳徳^{1, 2)}、寺田典子³⁾、石川誠³⁾、北川善政³⁾、
高山満利子⁴⁾、野村成規⁴⁾、鈴木正弘⁴⁾、河野牧子²⁾、
郁小兵²⁾、阿蘇雄²⁾、伊藤博²⁾、賀来亨⁵⁾、宇尾基弘⁶⁾、亘理文夫⁶⁾

1. 背景と目的

私たちは、「人工ECM幾何学」を提唱し、再生医療への重要性を強調してきた。組織の再生には、①細胞、②細胞外マトリックス（ECM）、③制御因子、④栄養供給、⑤力学刺激という5大要素の統合が必要であるが、そのうちECMについては、物理、化学、生化学的性質が詳しく追究されてきた一方、「人工ECMの幾何学的性質」の分析が等閑にされてきた。私たちはこの点に着目し、同一材料でも幾何構造によって組織の分化、成長に多大な影響を与えることを実証・報告してきた。今回、多数の直線状トンネルを有するハニカム構造が、骨・軟骨・血管の再生医療に極めて有効であることを見出したので報告する。

2. 実験方法

直径3mm、長さ1～4mmの円柱の長軸方向に、37個の内径0.3mmのトンネルを有する多孔性 β -TCP（ハニカム β -TCP）を試作した。対照としてトンネルの無い β -TCPを用い、BMPと共に、4週齢WKAH系雄ラットの背部皮下に埋植した。2～5週後、摘出物の生化学的分析（ALP活性）、脱灰組織切片の組織学的分析を行った。

3. 結果

埋植後、2週にしてトンネル内に直線的に、多数の毛細血管が入り込み、4mmの全長に達した。毛細

血管の伸長に平行し、それと競うように骨組織も直線的に成長した。トンネル入口付近には、内皮細胞・骨芽細胞の予備軍と推定される多数の未確認細胞が結集した。

4. 考察と結論

このハニカムbTCPは、①吸収性の骨補填剤として有効である。従来品に無い多くの特徴をもつのみならず、②血管新生と骨新生の相互関係研究に有用である。

5. 文献

久保木芳徳・他： 人工細胞外マトリックスの幾何学の統一原理、日本再生医療学会雑誌、再生医療、5：20-30、2006

久保木芳徳・他： 人工ECM細胞外マトリックスの幾何学、田畑泰彦、岡野光夫 編集、日本組織工学会監修、ティッシュエンジニアリング2006、東京、日本医学館、24-33、2006.

マイクロチタン粒子のキャラクタリゼーション

徳島大学大学院HBS研究部

生体材料工学分野

○浅岡憲三

1. はじめに

チタンが人工骨、歯科インプラントの材料として利用されている。その理由は、チタンが体液中で、アパタイトや骨性タンパクを獲得し、骨と融和 (Osseointegration) することにある。しかし、骨との融和には数ヶ月以上の長期間が必要である。そこで、融和の初期期間を短くする目的で、チタン表面を化学修飾し、融和を促進する試みがなされてきた。しかし、客観的に修飾したチタンの表面機能を評価する方法は確立していない。そこで、昇温脱離分析法により評価することの可能性を探った。骨融和機能に対する評価の指標が確立できると、アパタイト被覆チタン粒子の創製、およびその焼結体である生体機能をもつチタン多孔質体の合理的な開発指針ができる。また、チタン微粒子の生体内での挙動についての有用な情報が獲得できる。

2. 実験方法

蒸留水、室温での飽和水酸化カルシウム溶液(飽和溶液)、沈殿物をもつ状態の飽和水酸化カルシウム溶液(沈殿溶液)それぞれにチタンを浸漬し、オートクレーブ中で121℃、0.2MPaの状態に1時間保持した。処理後、デシケーター内で5時間真空乾燥した。その後、各試料を昇温脱離分析装置内の真空度 1×10^{-7} Paの環境下におき、試料からの脱離分子を質量分析計で測定した。次いで、試料を高真空中で昇温したときに脱離してくる分子を測定した。装置内で試料を冷却後、再度昇温しながら脱離分子を測定した。各処理を施したチタンを擬似体液に浸漬し、アパタイトの析出を観察した。

3. 実験結果

チタンを昇温脱離分析すると、水素が脱離してくる。α-Ti中で水素は水素化チタンとして存在することから、水素化チタンの脱離分析結果と同様な脱離挙動を示す(Ti-H状態図の共析温度は319℃)。また、標準試料の水素脱離測定結果からチタン、水素化チタン中の脱離水素量が定量的に測定できた。他方、200℃より低温では水の脱離が測定される。そこで、蒸留水、飽和溶液、沈殿溶液中で水熱処理した試料の脱離分析結果を比較した。

図1、図2に示すように、チタンを高真空中におくと脱離分子により真空度が下がる。このとき、脱離している分子のほとんどは水である。その後、真空中でチタンを加熱すると、図3に示すように水素の脱離が確認できる。また、標準試料の脱離解析を参照データとし、水素の定量測定ができる。同様に、図4に示すように200℃より低温域では水の脱離が測定される。この水はチタンが表面に保持していた水分子である。

カルシウムイオンを含む溶液中で処理したチタン表面には強固に水分子がついていることがわかる。試料表面からの水分子の脱離分子数を計算し表1に示した。この分子数はチタン表面のチタン原子数、酸化チタン表面のチタン原子数に比較して極めて多く、チタン表面に層状に水分子が存在していることを示唆している。この水分子の厚さを計算すると10~20 nmになった。測定された水の脱離分子数と試料を擬似体液に浸漬したときのアパタイトの析出との関係について調べた結果、有意な相関があることが確認された。以上のことから、チタン表面の水分子の厚さとアパタイト修飾能の間に相関関係があることが示唆された。

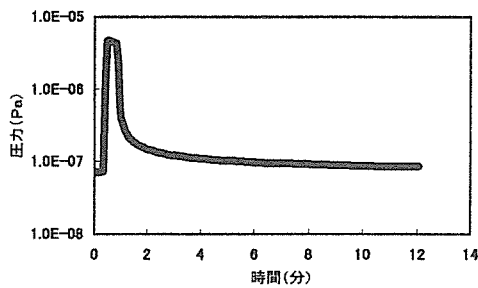


図1 チタンを真空中に保持したときの容器内圧力変化

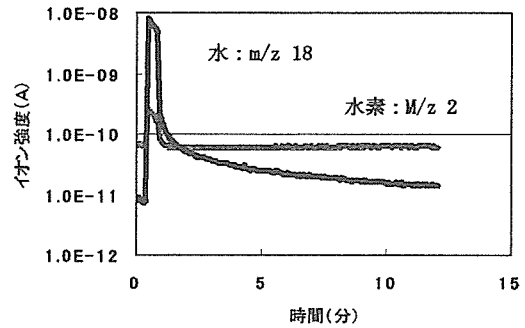


図2 チタンから脱離した分子

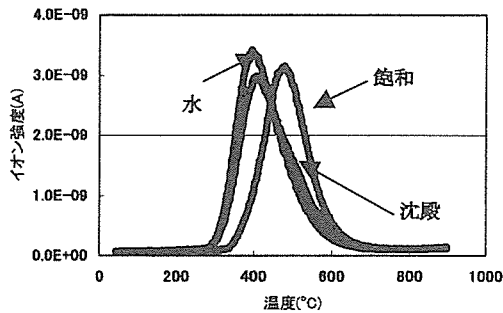


図3 各処理を施したチタンの脱離水素 (m/z 2)

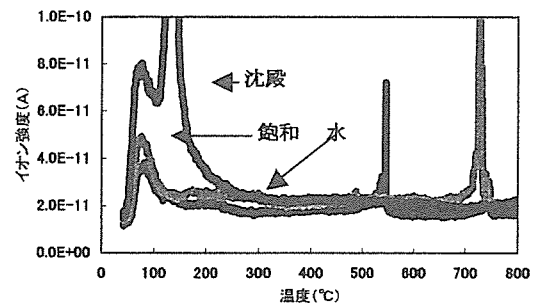


図4 各処理を施したチタンの脱離水 (m/z 18)

表1 昇温脱離分析による定量測定結果

	純水処理	飽和溶液	沈殿溶液
水素の分子数/10 mg	9.8×10^{16}	9.3×10^{16}	10.4×10^{16}
水の分子数/10mg	4.5×10^{15}	7.0×10^{15}	11.6×10^{15}
試料表面積 mm ²	14.4	13.9	13.3
脱離水の分子数/mm ²	2.9×10^{14}	4.5×10^{14}	7.5×10^{14}
水分子の厚さ/nm	8.7	13.5	22.5

謝辞：電子科学（株）前島邦光氏にご協力いただいたことを付記し、御礼申し上げます。

ヒップシミュレータ試験により発生したポリエチレン摩耗粉の形態解析

○橋本雅美、水野峰男

(財)ファインセラミックスセンター

Morphological Analysis of Wear Debris Generated from the Polyethylene Liner in a Hip Joint Simulator

○Masami Hashimoto and Mineo Mizuno

Japan Fine Ceramics Center 2-4-1, Mutsuno, Atsuta, Nagoya 456-8587

1. 緒言

人工股関節置換術において、超高分子量ポリエチレン (PE) 摩耗粉により引き起こされる骨吸収は深刻な問題である。この骨吸収が原因で人工関節の弛みが発生し、患者の QOL(Quality of Life)を著しく低下させている。現状では、PE 摩耗粉による炎症や骨吸収に関して完全に解明されていないが、摩耗粉のサイズ、量および形態により細胞応答の大きさが異なると考えられている。

そこで本研究では、ヒップシミュレータを用いた摩耗試験で発生する摩耗粉の回収を試み、その形状や粒径分布の評価を行った。

2. 実験

摩耗試験用部材のライナーには、PE ライナー(PE)とクロスリンク PE ライナー(CL-PE)を用いた。骨頭には、直径 26 mm のコバルトクロムモリブデン合金製(CoCr)骨頭を使用した。摩耗試験は、MTS 社製のヒップシミュレータを用いて行った。試験液からの摩耗粉の抽出方法は、試験後の潤滑液全量を凍結乾燥し、これに 5.0N-NaOH を加え蛋白質を溶解し、その後、メタノールを用いて脂質を溶解させた。さらに、密度を PE の 0.94 g/cm^3 付近に調整したイソプロピルアルコール/蒸留水の混合溶液および 1.05 g/cm^3 に調整したショ糖/蒸留水の混合溶液を注ぎ、遠心分離を行った。イソプロピルアルコール/蒸留水の混合溶液部分をスポイドで採取し、 $0.1 \mu\text{m}$ のフィルターを用いて吸引ろ過した。走査型電子顕微鏡(SEM)により抽出した摩耗粉を観察し、その形状や粒径分布の評価を実施した。

3. 結果と考察

ヒップシミュレータ試験において、ライナーの定常摩耗率は、PE の場合 $23.3 \text{ mg}/10^6 \text{ cycle}$ であり、CL-PE の場合 $5.43 \text{ mg}/10^6 \text{ cycle}$ (試験回数数が $2 \times 10^6 \text{ cycle}$ 以降)であった。 $0.5 \times 10^6 \text{ cycle}$ 試験後の摩耗粉の形状に関しては、PE の場合 $1 \mu\text{m}$ 程度の大きさで、形状は繊維状のものが多かった(図 1)。CL-PE の場合には、 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 程度の大きさで、形状は粒状のものが多かった(図 1)。

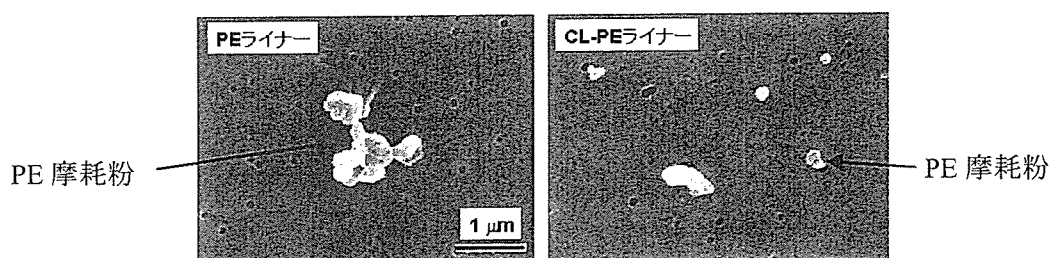


図 1 ポリエチレン摩耗粉の SEM 像(PE ライナー左図、CL-PE ライナー右図)

チタンの表面炭化によるインプラントへの耐磨耗性付与

北海道大学大学院歯学研究科 生体理工学教室

○朱 禹赫・宇尾基弘・赤坂司・亘理文夫

1. 【目的】

チタンは生体親和性に優れているが耐磨耗性に劣るため、人工関節の骨頭摺動部で摩耗粉を発生し、炎症を引き起こす。また、デンタルインプラントアバットメント部は口腔内露出部位でありプラークや歯石が付着しやすく、それらの除去は良好な予後を得るための必要不可欠な要件である。チタンはインプラント材料としてほぼ理想的な性質を有しもっともよく使用されているが、耐磨耗性に劣る欠点があり、アバットメント部の清掃には表面荒れを避けるため、一般的な金属製スケーラーは使用できず、プラスチック製スケーラーを使用しなければならないそこで上記の用途には耐磨耗性に優れた材料の使用が望ましい¹⁻³⁾。炭化チタン(TiC)は、硬さが極めて高いことが知られているが、人工関節とインプラントへの応用を想定した研究はほとんどない。本研究では、高周波誘導加熱浸炭処理法を用い、チタン表面を炭化処理し、耐磨耗性インプラント材料としての可能性を検討することを目的とした。

2. 【材料と方法】

板状(10×10×0.5mm)のJIS I種チタンを耐水研磨紙で#2000まで研磨後、2μmから0.05μmのダイヤモンド研磨液を用いて仕上げ研磨を行った。表1のように、1000℃~1400℃のベンゼンガス雰囲気中での高周波誘導加熱浸炭処理法によりチタン表面に炭化層を形成した。X線回折による生成物の同定、SEMとEDSによる試料表面と断面の観察分析、表面粗さ形状測定機による中心線平均粗さの測定を行った。また、マイクロビッカース硬さ試験、お

	Heating Temperature (°C)	Heating time	BenzeneC ₆ H ₆ Pressure (Pa)	Abbreviation
a)	1000	1h	2 × 10 ⁻³	10L
b)	1000	0.5h	6 × 10 ⁻³	10H
c)	1200	1h	2 × 10 ⁻³	12L
d)	1400	10sec	2 × 10 ⁻³	14L
e)				Ti

表1 各試料の製作条件

よびマルテンス引っかけ試験と超音波スケラーを用いた磨耗試験を行い、その条痕をデジタルマイクロスコープと表面粗さ計で評価した。

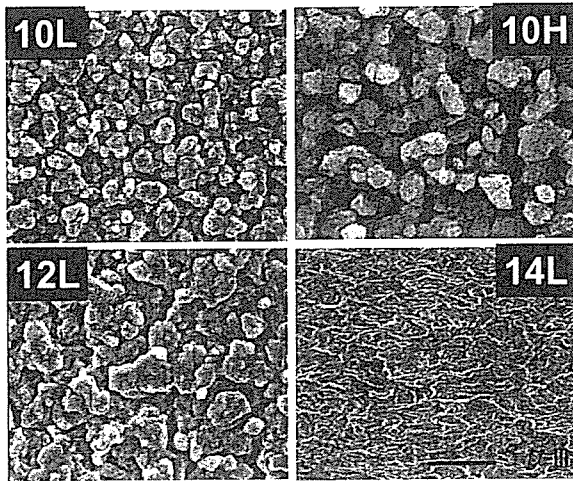


図1 表面 SEM 像

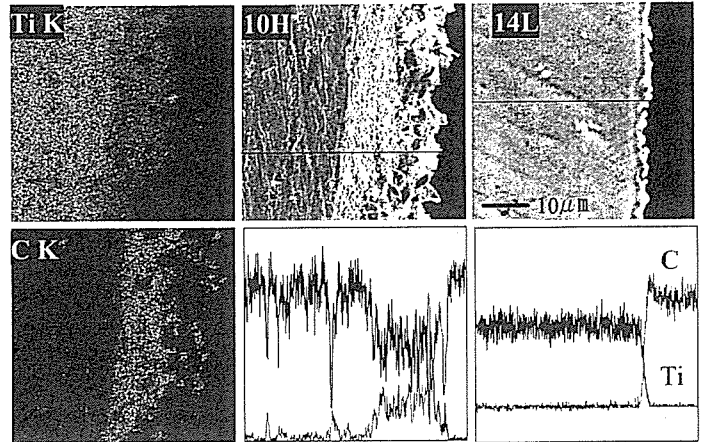


図2 EDS マッピングと線分析

3. 【結果と考察】

X線回折から炭化処理チタン表面にはTiCの生成が認められた。SEM観察(図1)から表面には粒状物が形成され、加熱温度、時間とともに、サイズが1~4 μm と増加した。断面観察からは1~25 μm の厚さの炭化層の形成が認められた。表面粗さは研磨後の0.05 μm に対し、高周波誘導加熱による炭化後では0.1~0.86 μm と大きくなった。

図2のEDSマッピング分析により、炭化層

内の炭素とチタン元素の分布が観察された。EDS線分析では、炭素濃度は表面から試料内部方向へ減少し、逆にチタンは増加した。ビッカース硬さは図3のような荷重依存性を示し、荷重200gfで純チタンの134から、炭化処理後2470へと飛躍的に増加し、測定時の荷重増加とともに減少した。これは荷重を増加すると圧痕が厚さ1~25 μm のTiC層を突き抜け、軟らかいマトリックスのチタンに至るためと考えられる。さらに炭化層下地の金属チタンに対しビッカース硬さ試験を行ったところ、内部の硬さ200に対し、表面近くの硬さは440を示した。このことは炭素が基板に浸入し固溶したためと考えられる。

SEM観察と表面粗さ測定により、試料表面に緻密で平滑な炭化層の形成が確認された加熱温度1400 $^{\circ}\text{C}$ 、ベンゼン分圧 $2 \times 10^{-3}\text{Pa}$ 、加熱時間10secの試料について、マルテンス引っかけ試験、超音波スケラーによる磨耗試験を行った。マルテンス引っかけ試験により、純

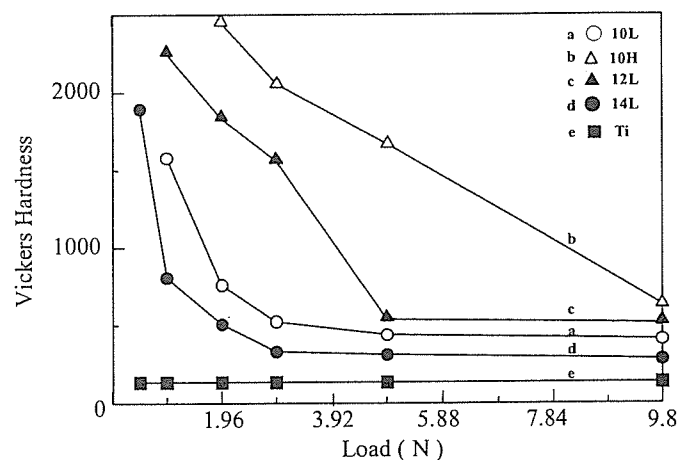


図3 ビッカース硬さの荷重依存性