

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

正常および癌肝細胞培養における CNT 添加の影響

主任研究者 亘理文夫 北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者 八若保孝 北海道大学歯学研究科教授
研究協力者 伊藤佐智子 北海道大学大学院歯学研究科大学院生

研究要旨 本研究においては、CNT が正常細胞と癌細胞へ及ぼす影響の違いを調べるため、ヒト正常肝細胞由来の HC 細胞とヒト癌肝細胞由来の HepG2 細胞の 2 種類の細胞株を用い CNT がそれぞれの細胞に及ぼす影響について観察、比較を行った。それぞれの細胞を 37℃、5%CO₂ 環境下にて 10 日間培養後、CNT を添加し、さらに 7 日間培養した後位相差顕微鏡にて細胞を観察した。添加された CNT は、正常細胞への付着は添加直後にみられたのに対し、癌細胞への付着は培養期間中ほとんどみられなかった。正常細胞では CNT 添加後も CNT 無添加群とほぼ同等の形状をしていたのに対し、癌細胞では CNT 添加後の細胞数が CNT 無添加群より著しく減少していた。また、CNT の影響が複数の細胞の中から選択特異的に働くかどうかを検証するために、正常細胞と癌細胞の両者を共培養する実験も行った。正常細胞と癌細胞の共培養ではいずれの培地においても細胞増殖がみられ、数種の形状をもつ細胞が認められた。

A. 研究目的

CNT は細胞に対して様々な興味深い影響を与えることを見出しているが、本研究では正常細胞と癌細胞へ及ぼす影響の違いを調べるため、ヒト正常肝細胞由来の HC 細胞とヒト癌肝細胞由来の HepG2 細胞の 2 種類の細胞株を用い CNT がそれぞれの細胞に及ぼす影響について観察、比較を行った。また、CNT の影響が複数の細胞の中から選択特異的に働くかどうかを検証するために、正常細胞と癌細胞の両者を共培養する実験も行った。

HepG2 細胞

使用培地 : HC 細胞には専用の CS-C 培地 (Cell systems 社)、HepG2 細胞には DMEM 培地を用いた。

培養環境 : 37℃、5%CO₂ 環境下にて 10 日間培養後、CNT を添加し、さらに 7 日間培養した後位相差顕微鏡にて細胞を観察した。

2) 正常細胞と癌細胞の共培養

HC 細胞用の CS-C 培地と HepG2 細胞用の DMEM 培地のそれぞれに HC 細胞と HepG2 細胞を播種し、ディッシュ底面にて 80%コンフルエントを超える状態まで 20 日間培養を行った。

B. 研究方法

1) MWCNTの添加による細胞への影響

CNT はあらかじめオートクレーブにて滅菌を行った。

使用細胞株 : ヒト正常肝細胞由来の HC 細胞
およびヒト癌肝細胞由来の

C. 研究結果

Fig.1 は培養 10 日後の位相差顕微鏡写真である。正常肝細胞ではディッシュ底面全体に一面に広がる

ように増殖し、コンフルエントに達するのに対して癌肝細胞では細胞が局所に積層状に凝集しコロニーを形成していた。

Fig.2 は Fig.1 での培養後、CNT を添加しさらに培養 7 日後の位相差顕微鏡写真である。添加された CNT は、正常細胞への付着は添加直後にみられたのに対し、癌細胞への付着は培養期間中ほとんどみられなかった。正常細胞では CNT 添加後も CNT 無添加群とほぼ同等の形状をしていたのに対し、癌細胞では CNT 添加後の細胞数が CNT 無添加群より著しく減少していた。

また、正常細胞と癌細胞の共培養ではいずれの培地においても細胞増殖がみられ、数種の形状をもつ細胞が認められた。形成されたコロニーの周辺部には癌細胞様の細胞が、中心部には正常細胞様の細胞が多く観察された。

D. 考察

CNT 添加によって正常肝細胞および癌肝細胞に対する影響には大きな違いが認められた。添加直後から CNT は正常細胞に付着している様子がみられたが、癌細胞にはほとんど付着せず、CNT は培養液中を浮遊した状態が観察された。よって CNT 添加後に癌細胞数の著しい減少がみられたことは、CNT と癌細胞の付着がほとんど観察されなかったことから CNT の細胞に対する直接的な影響は考えにくい。このメカニズムを明らかにしていくことが今後の研究課題である。

E. 結論

今回の結果より、①正常細胞と癌細胞ではそれぞれ単独培養中の増殖パターンが大きく異なること、②CNT の細胞に及ぼす影響も細胞の種類によって大きく異なることが示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. 伊藤佐智子、八若保孝、赤坂司、亘理文夫、ナノ微粒子体内動態可視化法の開発研究会 2008

G. 知的所有権の取得状況

なし

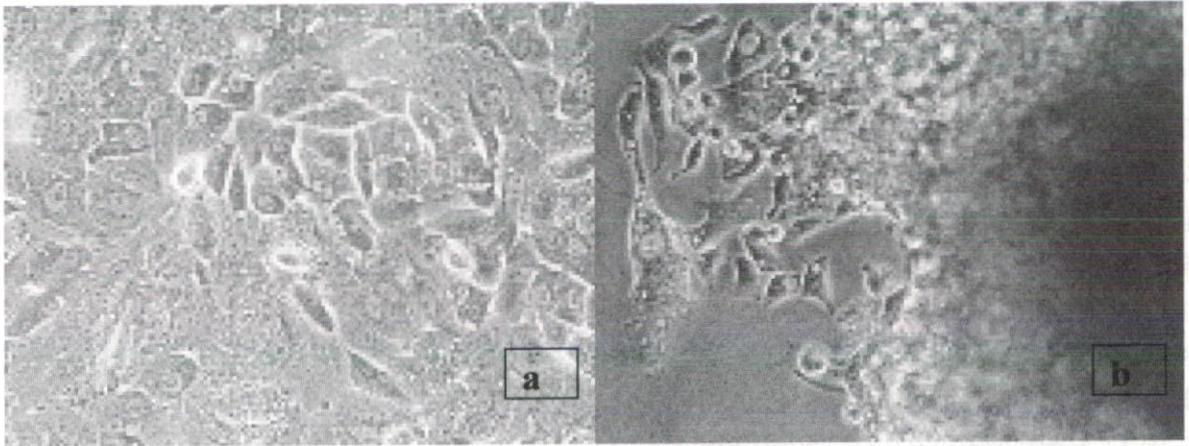


Fig.1 :培養 10 日後の位相差顕微鏡像。a:正常細胞、b:癌細胞像である。癌細胞では培養細胞が積層し、厚さが増大している。(右方部)

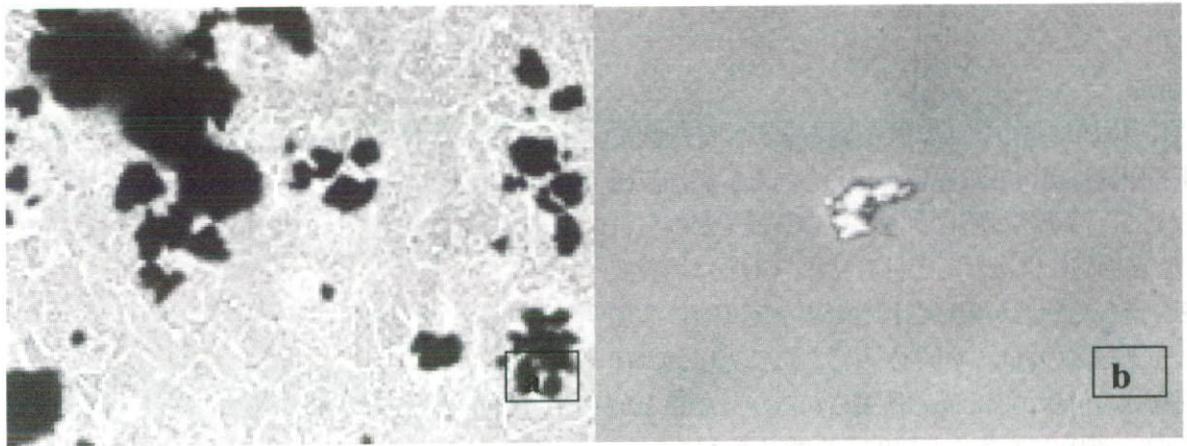


Fig.2 : Fig.1 にて 10 日間培養後に CNT を添加した後、さらに培養 7 日後の位相差顕微鏡像。
a:正常細胞 b:癌細胞

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

骨芽細胞様細胞の成長に及ぼす Imogolite 及び CNTs スキャホールドの影響

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	八若保孝	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	石川紘佑	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 本研究では、Imogolite のバイオ応用を検討した。

Imogolite は、自己組織化能を有する粘土鉱物の 1 つであり、およそ外径 2nm、内径 1nm、長さ数 μm の白色ナノチューブである。

今研究では、Imogolite 分散液を作製し、Imogolite を cell culture dish 上に直接コートしスキャホールドとした。作製したスキャホールド上で 14 日間、骨芽細胞様細胞 (Saos2) を培養後、細胞数計測及び、SEM による形態観察を行った。比較対象として、形態の似通った、Single wall carbon nano tubes (SWCNTs) を使用した。

Imogolite 上で細胞は良好に増殖した。細胞数、形態では SWCNTs とほぼ同様の結果を示した。cell culture dish と比較すると、ナノチューブ上の細胞は形態が多様で、分化に有利であると考えられた。

A. 研究目的

Imogolite は高い比表面積及び保水性を有するアルミノシリケートであり、柔軟性および自己組織化能を持った直径約 2nm の白色ナノチューブである。本研究では、Imogolite 及び SWCNTs を cell culture dish 上にコートし、スキャホールドとした。さらに、作製したスキャホールド上で細胞培養を行い、細胞成長に対するスキャホールドの影響を検討した。

B. 研究方法

Imogolite は、天然産出量が極わずかであり、鉄を主とした不純物を含むため、今研究では合成物 (産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 地下環境機能研究グループ 鈴木正哉) を使用した。SWCNTs は、名城ナノカーボン社製 FH-P を使用した。

まず、1000ppm Imogolite 及び 5ppm SWCNTs 分散液を作製し、cell culture dish 上にコートしスキャホールドとした。作製したスキャホールドの表面粗

さ及び、ぬれ性を測定した。得られたスキャホールド上でヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) を所定期間培養し、固定、乾燥の後、細胞数計測及び、SEM にて細胞形態観察を行った。

さらに、蛍光ラベルされたアルブミンを用い、蛋白質吸着試験及び、9000ppm NaF 溶液を用い、フッ素イオン吸着試験も行った。イオン計測にはフッ素複合電極 (Thermo Orion) を使用した。

C. 研究結果

スキャホールド上にて、14 日間ヒト骨芽細胞様細胞の培養を行ったところ、強い細胞接着および伸展形態が観察された。

また、コントロールである cell culture dish と比較したところ、ほぼ同等な良好な細胞増殖が認められた。

一方で、Imogolite 及び SWCNTs 上では細胞表面に多くの生成物が観察される傾向があり、分化に有利である可能性も考えられた。

また、ImogoliteはCNTsと同様に高いタンパク質吸着能があり、細胞の初期接着に有効と考えられる。

イオン吸着試験では、SWCNTsがほとんど吸着しなかったのに対し、Imogoliteは、フッ素イオンを、多量に吸着した（自重のおよそ75%）。この性質は、Imogoliteをフッ素にて修飾し、歯科充填材料に導入するなど種々の用途に応用可能と考えられる。

D. 考察

Imogolite スキャホールド上の多様な細胞形態及び、生成物より分化に有利であることが推測される。しかし、今研究での、SWCNTs との比較から、Imogolite のどの要素が細胞培養に有利に働いたのか解明できなかった。今後、ALP 活性等種々の生化学的アッセイを行い、その有効性を検討してゆく必要があると考えられた。

E. 結論

Imogolite は細胞培養に、有効な材料であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1. 石川紘佑、赤坂 司、八若保孝、亘理文夫 “イモゴライト上での細胞培養”、第51回粘土科学討論会講演要旨集、P144 北海道、札幌市 2007

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

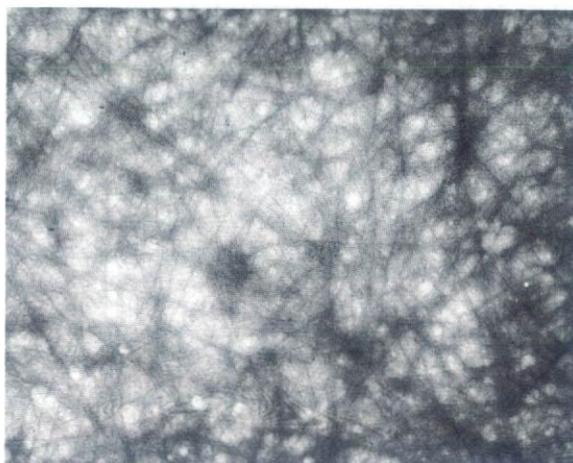


図1 Imogolite TEM 像(×50000)

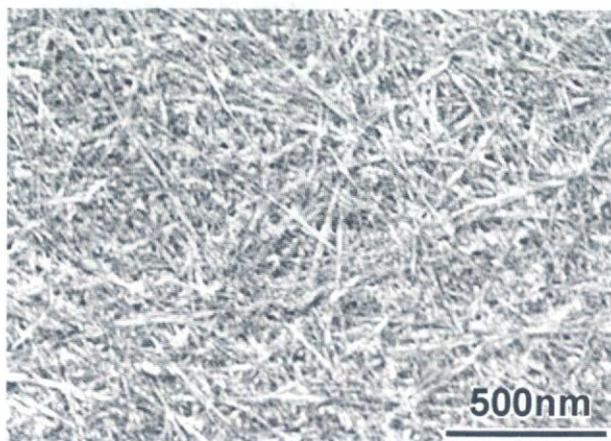


図2 Imogolite スキャホールド SEM 像

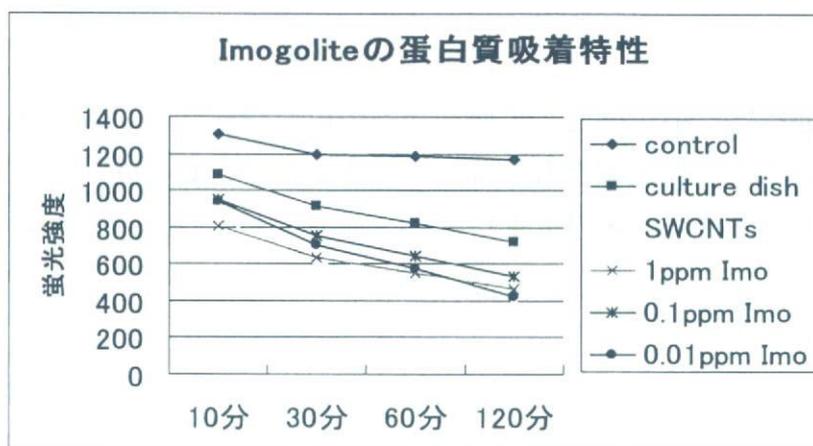


図3

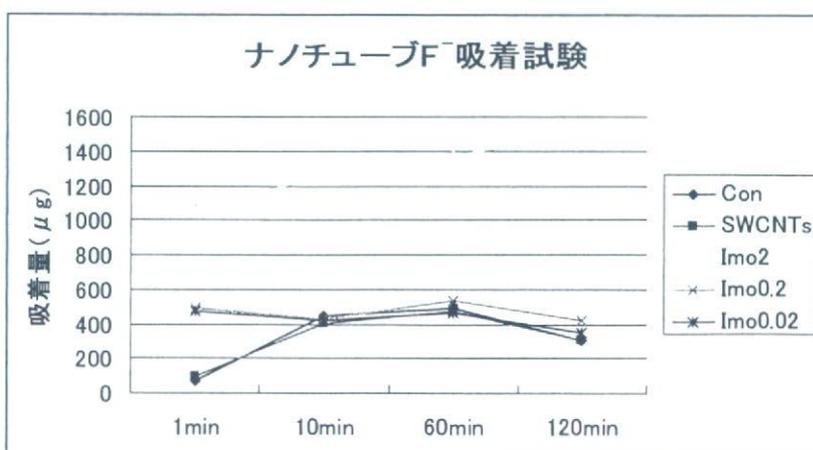


図4

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

生体と無機ナノ粒子のかかわりと応用に関する研究

主任研究者 巨理文夫
研究協力者 米澤 徹

北海道大学大学院歯学研究科教授
東京大学大学院理学系研究科准教授

研究要旨 本研究においては、生体と無機ナノ粒子のかかわりとその応用について検討を重ねる材料として以下の金属および金属酸化物のナノ粒子製造を引き続き行った。無機ナノ粒子と生体のかかわりについては、その粒子の材質もさることながら、表面に吸着している分子が大きく影響することは明白である。さらに大きさ、形状、表面電位など、様々なファクターが関与することが考えられる。今回は、突起などをもったいびつな形状をもつナノ粒子の製法の開発ならびにその応用について検討した結果について述べる。応用例として選んだものは、レーザー脱離イオン化法による質量分析である。また、保護剤を有しない金属ナノ粒子のレーザーアピュレーションによる製法について、さらに検討を重ねた。

A. 研究目的

無機物質・有機物質問わず、ナノ材料に対する関心が近年高まってきており、様々な物質のナノ化が行われてきた。金属、金属酸化物、ポリマー、錯体、有機低分子、いずれの物質のナノ粒子もこれまでに得られない特異な物性を示しうる材料として殊に注目を浴びている。

こうしたナノ粒子は、触媒、磁性材料、バイオセンシング、抗菌作用、色材、電子材料、電極材料、配線材料、機能物質担体、光学材料、医用材料、化粧品などに幅広い応用が期待されている。そのなかでも特に、金属（単体・合金）や金属酸化物（複合酸化物も含む）のナノ粒子は近年多目的な応用が期待され、新規材料として沢山の研究が国内外問わず報告されている。

ナノ粒子と生体とのかかわりについても、近年大きな研究対象となっている。バイオへの応用は少量で高い効果、有機化学的手法の応用の平易さから多くの研究者らが参入している分野である。また、相対的に高価な材料として販売できることからベンチ

ャービジネスとしても大きく脚光を浴びている。例えば従来から、例えば、様々な粒子径・形状を有する金ナノ粒子を利用した電子顕微鏡の生体サンプルの染色であったり、吸収波長が粒子の大きさや凝集形態によって変化するプラズモン吸収と抗原抗体反応を利用した特定のタンパク質や糖鎖の存在の実証、例えば、ウィルス検査薬、妊娠検査薬などに利用されている。

さらに、工業用途としては、比較的高温での焼結と組み合わせて、金属光沢を出すための色材としても利用されている。また、白金族のナノ粒子はこれまで様々な化学反応のための触媒として利用されてきており、最近では、活性酸素除去能があることが示され、より生体とのかかわりの深い場面で使用され始めている。一方、金属酸化物のナノ粒子は、化粧品用途はもちろんのこと、チタニアは、光触媒や白色顔料として多用されている。また、酸化鉄マグネタイトなどの磁性粒子は、ハイパーサーミアなどの磁気医療分野への展開も図られている。

そこで、本研究協力者は、生体と無機ナノ粒子と

のかかわりをテーマに研究を重ねている。本年度は、新奇な形状をもつ白金ナノ粒子の調製と応用、ならびにレーザーアビュレーションによるナノ粒子の製造と応用について検討を重ねたので報告したい。

B. 研究方法

まずは、保護剤を用いない新奇形状を持つ白金ナノ粒子の製法と応用の検討を行った。塩化白金(IV)酸を水に溶解させ、激しく攪拌している状態で、還元剤である水素化ホウ素ナトリウムを系内に導入した。そのまま激しく攪拌を続けると次第に黒色の沈殿が生じてくる。その沈殿をメンブレンフィルターを用いてろ過した後、数回、超純水で洗浄したのちに、真空乾燥して粉体として得た。

乾燥した粉体は安定で、黒色のまま長期間大きな変化は見られない。この粒子を再度水に超音波照射を用いて分散させた。SEM サンプルホルダーに乗せたのち乾燥して形状観察をした。SEM 装置は、JEOL 社製 JSM-7401FNT を用いた。極力高倍率で観察することを心がけた。さらに、この白金粉の透過型電子顕微鏡写真を日立製 HF-2000 (フィールドエミッション型) を加速電圧 200 kV で用いた。AFM 観察は SII 社製 AFM 装置を使用して行った。

また、レーザーアビュレーションを用いたナノ粒子の製造については、金属インゴットもしくは粗大な金属粒子にパルスレーザー(532 nm)を 10 Hz で照射してナノレベルに粉碎することによって、媒体に分散したナノ粒子分散液を得ることに成功した。得られたナノ粒子の TEM 写真を日立製 HF-2000、H-800 (LaB₆型) を用いて加速電圧 200 kV で観察した。

(倫理面への配慮)

今回、ヒト、動物をもちいた実験は行っておりません。

C,D. 研究結果と考察

白金粉は、塩化白金(IV)酸からの還元によって比較的容易に調製することができた。還元剤である水素化ホウ素ナトリウムの投入時には、急激に反応が進行し、多くの水素が発生し泡が生成することと、溶液がアルカリ性になるため、実験めがねをかけることはもちろんのこと、周囲には注意が必要である。しばらく攪拌していると、黒色沈殿がみられてくる。

この沈殿を 0.2 ミクロン程度のポアサイズを有する親水的なメンブレンフィルターでろ過をすることで沈殿を回収することが可能である。得られた沈殿は、さらにメンブレンフィルター上で何度も超純水を用いて洗浄を行い、不要なイオンの除去を繰り返した。

その後、フィルターごと真空乾燥装置で 1 晩乾燥させて、粉体として取り出し、空気中で安定に保存できた。

こうして得られた白金粉の微細構造について、SEM、TEM、AFM で観察した。SEM での観察結果を図 2 に示す。全体に 2-30 nm の大きさの粒の凝集体が得られていることが分かる。図 2 を詳細に観察すると、粒子の表面に白い線が入っていることが観察される。これは、板状の突起が粒子表面に成長していることを示している。一般的に、ナノ粒子は球状のものが得やすいが、結晶成長の制御によりロッドや板状になることが知られている。白金の例は少ないが、キュービックのものなどの例もある。今回は、還元剤の一度の添加という過剰な原子生成過程を経たナノ粒子生成のため、こうした板状結晶の成長は、全体として結晶成長が均一に起こらなかったとからであると推測される。

この白金粉は、ナノレベルの大きさであって、それに平板上突起がついているものであったので、図 2 にみられる突起を「花卉」と考え、「ナノフラワー」と名づけることにした。

この白金ナノフラワーを用いて、いくつかの MALDI-TOF-MS で代表サンプルとしてもちいられるペプチドの質量分析を行って見たところ、いずれもフラグメントピークなどを発生させずに「ソフトイオン化」に成功した。これまで SALDI-TOF-MS では難しかったシトクロム C のソフトイオン化にも成功している。最大で、20 kDa の質量の有機分子をイオン化できることが見出された。

さらに、本白金ナノフラワーを用いる利点として、低サンプル量での質量分析可能性があることを見出した。例えば、アンジオテンシン I では、700 amol (サブフェムトモル) での検出が可能となってきたおり、非常に高感度である。従来の SALDI よりも 1000 倍近い感度特性を示していると考えられる。こうした感度の向上は、今後期待されるマスマッピングなどにも非常に有効であると思われる。さらに、

MALDI-TOF-MS で常に懸念される低分子量領域での有機マトリクス分子からの分解ピークも抑制され、今後、薬品などの分析への SALDI-MS の展開が期待される。これまで、金を用いた SALDI-MS については報告されていたが、レーザー照射によって金原子、金クラスターのピークが見られた。しかしながら、白金はその結晶性の高さ、融点の高さからレーザー照射によりフラグメントイオンを発生させる可能性が極めて小さい。この点は、白金の有効性を示すものといえ、非常に期待される。

SALDI-TOF-MS に金属ナノ構造体を使用するに当たり、金属種による違いについて検討を行った。用いた金属ナノ粒子は、表面の清浄性の確保から、レーザーアブレーション法を用いて行った。用いた金属は、金、銀、銅、白金である。この4種の金属においては、金、白金が優れた SALDI-MS 特性を示すものの、銀、銅はレーザーパワーを上げて、ペプチドのイオン化ができず、SALDI-MS 特性が見られなかった。金、白金の中では、上記に示したように白金が優れていることが示されており、金属ナノ構造体の SALDI-MS では白金が良好であることが示されたといえる。

E. 結論

本研究において、様々な金属ナノ粒子の中で白金が SALDI-TOF-MS の支援材料として有効であることが示された。さらに、ナノレベルでの凹凸が、選りすぐれた SALDI-MS 特性を示すことが見出され、今後、新しいナノ構造の設計・合成により、さらに高効率な SALDI-MS システムの構築が可能となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 米澤 徹 編集、「ナノ粒子の創製と応用展開」、フロンティア出版 (2008).
2. H. Kawasaki, T. Yonezawa, T. Watanabe, and R. Arakawa, "Platinum Nanoflowers for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules", *J. Phys. Chem. C*, **111**(44), 16278-16283 (2007).
3. T. Yonezawa, K. Kamoshita, M. Tanaka, and T. Kinoshita, "Easy Preparation of Stable Ion Oxide Nanoparticles Using Gelatin as Stabilizing Molecules", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **47**(2),

1389-1392 (2008).

4. T. Yonezawa, S. Takeoka, H. Kishi, K. Ida, and M. Tomonari, "Preparation of copper fine particle paste and application of this paste as material of inner electrodes of multilayered ceramic capacitor (MLCC)", *Nanotechnology*, **19**, 145706 (2008).
5. F. Watari, S. Abe, C. Koyama, A. Yokoyama, T. Akasaka, M. Uo, M. Matsuoka, Y. Totsuka, M. Esaki, M. Morita, and T. Yonezawa, "Behavior of in vitro, in vivo, and internal motion of micro/nano particles of titanium, titanium oxides and others", *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**(1), 1-5 (2008).
6. T. Yonezawa, T. Itoh, N. Shirahata, Y. Masuda, and K. Koumoto, "Positioning of Cationic Silver Nanoparticle by Using AFM Lithography and Electrostatic Interaction", *Applied Surface Science*, in press.
7. T. Yonezawa, Y. Yamanoi, and H. Nishihara, "Cross-sectional STEM Observation of Nanoparticle-Attached Silicon Wafer: Specimen Prepared by Focused Ion-Beam", *J. Nanosci. Nanotech.*, in press.

2. 学会発表

1. T. Yonezawa, N. Shirahata, Y. Yamanoi, N. Terasaki, S. Yamanoi, K. Uchida, and H. Nishihara, "Photo-assisted Immobilization of Nanoparticles onto Si Surface and Their Structure", 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes (福岡・福岡サンパレス)
2. 藤田真士、荒井重勇、齋藤徳之、米澤 徹、黒田光太郎、"種々の基板における金属微粒子の熱安定性"、日本金属学会 2007年秋期(第141回)大会 (岐阜・岐阜大学)
3. 内田一樹、堀之内慎太郎、山野井慶徳、米澤 徹、寺崎 正、西原 寛、"シリコン(111)基板上に固定化した独立金ナノ粒子の電気特性"、第56回高分子討論会 (名古屋、名古屋工業大学) (2007).
4. 米澤 徹、川崎英也、渡辺健宏、荒川隆一、"SALDI-MS マトリクスのための白金ナノ構造体"、第56回高分子討論会 (名古屋、名古屋工業大学) (2007).
5. 米澤 徹、川崎英也、渡辺健宏、荒川隆一、"ZnO を利用した SALDI 質量分析"、第56回高分子討論会 (名古屋、名古屋工業大学) (2007).
6. Y. Yamanoi, K. Uchida, T. Yonezawa, N. Terasaki, and H. Nishihara, "Structures of Gold Nanoparticles Immobilized onto Hydrogen-terminated Silicon(111) Surface", Third International Symposium on Chemistry of Coordination Space (兵庫・淡路島)
7. 米澤 徹、"金属ナノ粒子の製法、解析と応用"、新型超高压

電子顕微鏡の開発とその産業への応用に関する研究会(名古屋・名古屋大学)

8. 米澤 徹、川崎英也、渡辺健宏、荒川隆一、「金属ナノ構造体を用いる LDI 質量分析」、平成 19 年度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」H19 年度冬期研究班研究成果発表会(苫小牧・北海道)
9. H. Kobayashi, K. Takeda, T. Yonezawa, "Solid-State ^{195}Pt NMR Measurements of Pt Nanoparticles Protected by Organic Materials" 49th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (2008/3, California)
10. 米澤 徹、"有機膜被覆金属微粒子ハイブリッド材料の展開"、日本化学会第 88 春季年会(東京・立教大学)(2008)(依頼講演)
11. 井田清信・友成雅則・米澤 徹、"生体由来高分子を被覆した抗酸化性銅ナノ粒子の液相合成"、日本化学会第 88 春季年会(東京・立教大学)(2008)
12. 米澤 徹・友成雅則・竹岡伸介・井田清信・岸 弘志、"銅ナノ粒子の電極材料への展開"、日本化学会第 88 春季年会(東京・立教大学)(2008)
13. 川崎英也・西村光一・米澤 徹・荒川隆一、"2成分系イオン液体を反応場として生成するサブミリメータサイズの金ナノプレート"、日本化学会第 88 春季年会(東京・立教大学)(2008)
14. 荒川隆一・杉谷 剛・渡辺健宏・米澤 徹・川崎 英也、"金ナノ粒子/高分子交互積層シリコン基板を利用した SALDI-MS"、
15. 森 大輔・米澤 徹・西原 寛、"銀ロッドの形状と物性"、日本化学会第 88 春季年会(東京・立教大学)(2008).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

米澤 徹、川崎英也、荒川隆一、渡辺健宏、「LDI プレート、レーザー脱離イオン化質量分析装置、レーザー脱離イオン化質量分析方法及び LDI プレート製造方法」、2007 年 2 月 16 日、特願 2007-36658 (東京大学、関西大学)

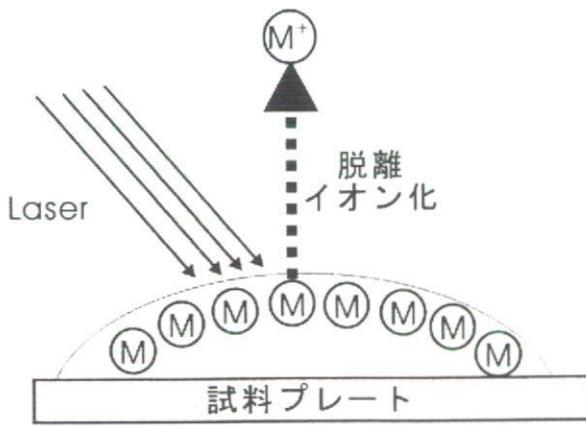


図1 MALDI-TOF-MS のイメージ図

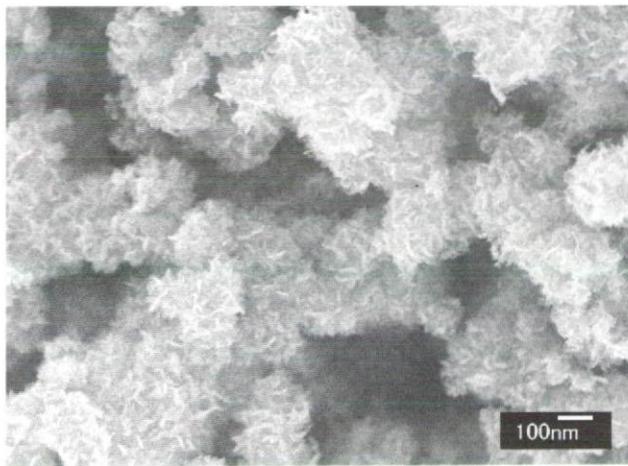


図2 白金ナノフラワーのSEM写真(白色の部分が突起部分である)

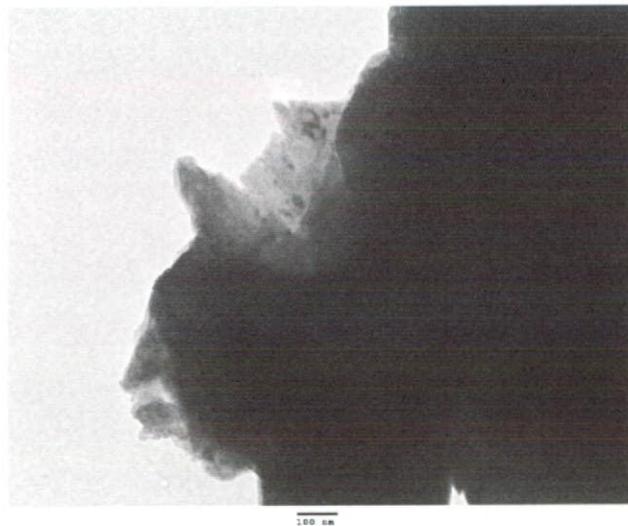


図3 白金ナノフラワーのTEM像

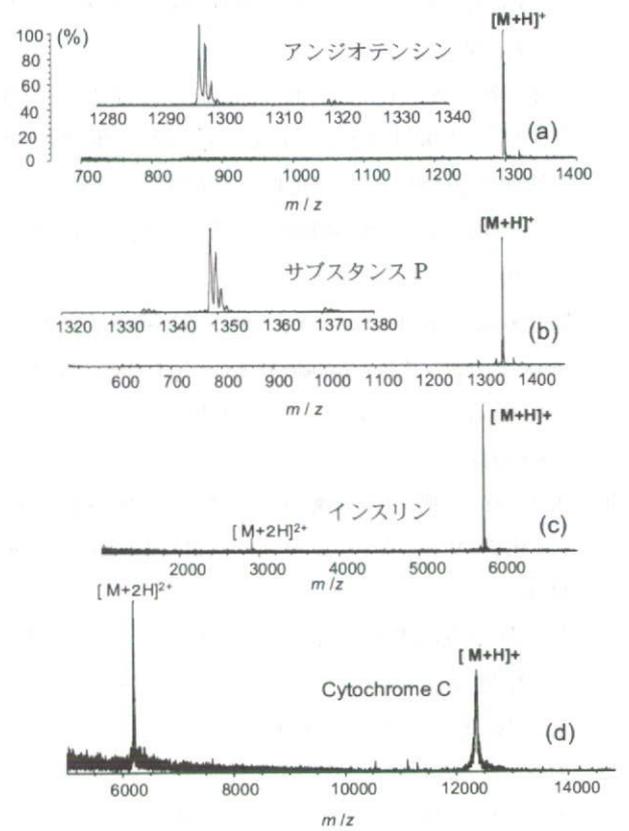


図4 白金ナノフラワーを用いたペプチドの質量分析スペクトル。いずれもソフトイオン化に成功している。

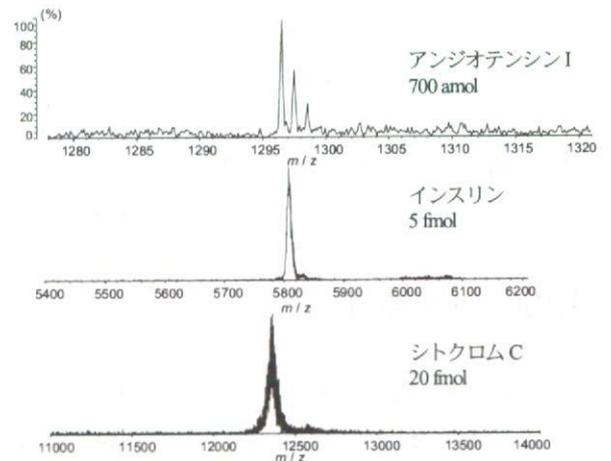


図5 白金ナノフラワーを用いたペプチドの質量分析スペクトル。それぞれのペプチドを非常に少量で検出した。

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

歯科・生体材料周囲組織中金属元素含有微粒子の形態・状態分析と 金属製生体材料の生体適合性評価

主任研究者	亘理 文夫	北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者	宇尾 基弘	北海道大学大学院歯学研究科准教授
研究協力者	朝倉 清高	北海道大学触媒化学研究センター教授
研究協力者	小野寺 伸	北海道大学大学院医学研究科准教授
研究協力者	大貫 惣明	北海道大学大学院工学研究科教授

研究要旨 チタンやコバルトクロム合金など高耐食性の金属が歯科・医用材料に用いられているが、周囲組織中に溶出や摩耗に由来すると思われる金属を含む微粒子状物質の存在が懸念されている。本研究では歯科用インプラントや人工関節周囲組織を透過電子顕微鏡及びX線吸収測定を行って、これら微粒子の形態や化学状態を分析した。歯科用チタンインプラント周囲には数十nmの二酸化チタン微粒子が観察され、人工関節周囲にはサブミクロンの金属微粒子が観察された。これらは生体内で溶出や摩耗により発生したものと考えられ、金属系歯科・生体材料周囲で発生する各種微粉末の形態・状態が明らかになった。

またNi-Ti合金の水素チャージにより水酸化ニッケル様の微粒子が生成することが判明しNi-Ti合金の生体内での挙動を水素脆化の観点から見直す必要があると考えられた。さらに透過電子顕微鏡用雰囲気制御セルの生物系試料の透過電子顕微鏡観察における有用性も明らかにした。

A. 研究目的

チタンは耐食性や生体適合性に優れていることから歯科や整形外科用インプラントとして用いられているが、一部の試料では溶出に起因すると思われる二酸化チタンが周囲組織から検出されることがある。人工関節には各種金属材料が使用されているが、長期間の使用により摩耗粉が発生し、関節周囲組織に沈着する事例が見られる。

また歯科・医用材料として広く用いられているNi-Ti合金は水素脆化が起こりやすく、生体内で腐食時に発生する水素による脆化が懸念されている。これら生体用金属材料の腐食による溶出物や生成微粒子の形態や化学

状態を評価することは、生体適合性を評価する上で極めて重要である。特に生体内で生成するナノ/マイクロ微粒子の形態・状態を評価することは極めて重要である。

本研究では歯科用インプラント及び人工関節周囲組織にふくまれる微粒子状物質のTEM観察とXAFS測定を行い、インプラント等に由来する微粒子の形態と状態を評価した。またチタン基合金では水素吸蔵による劣化が懸念されており、生体材料として用いられるNi-Ti合金では水素チャージ処理で多量の微粒子が生成することが知られている。そこでNi-Ti合金およびSUS316Lから発生する腐食生成物のXAFSによる状態分析も同時に行った。

さらにTEM用雰囲気制御セルを生体材料の観察に応用するため、石膏粉末を用いて温度、雰囲気によるin situ観察を試みた。

B. 研究方法

【歯科用インプラント及び人工関節周囲組織中の微粒子観察】

二酸化チタンを含むことが判明している歯科用チタンインプラント周囲のヒト歯肉組織を樹脂包埋、薄切したものを透過電子顕微鏡(TEM: JEM-2010、200kV)で観察し、組織に含まれる二酸化チタンのサイズと形態を観察した。

また人工関節周囲から摘出された関節組織(2例)を通法に従い樹脂包埋・薄切し、TEM観察して、内部の微粒子のサイズ・形態を観察した。また凍結乾燥した同組織を高エネルギー加速器研究機構放射光共同利用施設を用いてX線吸収微細構造(XAFS)解析を行い、微粒子の状態分析を行うと共に、組織を濃塩酸中で加熱溶解し、ICPにより組織中の金属元素濃度を定量した。使用されていた人工関節の材質は以下の通り。

試料A: ヘッド=Co-Cr、カップ=Co-Cr、
試料B: ヘッド=Co-Cr、カップ=Ti

【Ni-Ti合金の水素チャージ時の生成微粒子の状態分析】

Ni-Ti合金およびSUS316Lを0.9%NaCl溶液または疑似体液(SBF)中で水素チャージした後の生成微粒子を乾燥し、CoおよびFeのK吸収端のXAFS測定を行って、生成微粒子中のNiおよびFeの状態分析を行った。

【TEM用雰囲気制御セルを生体材料の観察に応用】

TEM用雰囲気制御セルを生体材料の観察に応用するため、石膏粉末を雰囲気制御セル中で真空/大気雰囲気下で温度を変化させ、TEM(JEM-2010)を用いて結晶構造変化のin situ観察を試みた。

C. 結果

【歯科用インプラント及び人工関節周囲組織中の微粒子観察】

図1は実際の歯科用インプラント周囲組織中のチタンのXANESスペクトルであり、組織中のチタンがアナターゼ(二酸化チタン)であることがわかった。このアナターゼの由来としてはチタン表面の酸化皮膜の脱落と溶出したチタンの酸化の両面が考えられるため、高分解能TEMを用いてチタンの形状の観察を行った。図2に酸化チタン含有組織のTEM像を示す。粒径数十nmの均一な粒子が観察され、回折像からアナターゼであることが推測された。また同粒子のEDSスペクトルでも明瞭なチタンのピークが観測され、図1で示した組織中のアナターゼの形状が判明した。これらの粒子は均一な粒径であることから、インプラント体表面からの脱落などではなく、生体内で溶解したチタンから析出したものと推測され、生体内で生成した微粒子が観測できた例として興味深いと思われる。

関節包試料中の各元素濃度(wet重量比、ppm)を表1に示す。Coが顕著に検出されており、試料B(カップがチタン製)ではTiも高濃度に検出されている。試料B中に含まれる微粒子のTEM像とCoのK-edge XANESスペクトルを図3に示す。XANESから同試料中のCoが金属状態と推測され、TEMからも大きさが1 μ m以下の摩耗粉と思われる粒子が観測される。これより、ヘッド及びカップに由来する摩耗粉が金属状態で関節包に含まれていると考えられる。この傾向は試料Aでも同様であり、含有金属量は埋入期間が長い試料(B)の方が明らかに多い。溶出状態のCoはXANESスペクトルでは検出されていない。

【Ni-Ti合金の水素チャージ時の生成微粒子の状態分析】

Ni-TiおよびSUS316Lを0.9%NaCl溶液または疑似体液(SBF)中で水素チャージした後の生成微粒子のNi及びFe K-edge XANESスペクトルを図4に示す。Ni-Ti合金から生成した微粒子

中のNiは水酸化物様のスペクトルを示し、SU S316Lからの微粒子中のFeはFeOOHに類似したスペクトルを示している。Ni-Ti合金からの生成物についてはNaCl溶液とSBFで反応させた場合の顕著な差は見られなかった。いずれの試料でも生成物は水酸化物となっており、今後更に他の合金成分の状態についても検討する必要がある。

【TEM用雰囲気制御セルを生体材料の観察に応用】

図5は雰囲気制御セル中で普通石膏を真空下で加熱した状態（126℃）、図6はその後に大気暴露し、室温まで冷却した状態でのTEM像と回折像を示している。石膏は大気中では160～170℃で二水石膏から半水石膏に分解（ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O} + 3/2\text{H}_2\text{O}$ ）する。加熱真空下と室温大気下で回折像の違いは見られず、現状で分解・水和反応のその場観察には至っていない。その理由として雰囲気制御セルが同一粒子を連続観察しているとセルの透過性が徐々に低下するため、視野を変えながら観測する必要があることがあげられるが、特に高真空で変質しやすい生物系試料を大気雰囲気中で高分解能透過電子顕微鏡観察を可能にする点で極めて有用な装置と評価された。

D. 考察

歯科用インプラント周囲組織のTEM観察により、組織中のanataseは50nm前後のナノ微粒子であり、粒径がそろっていること、いずれも単結晶粒子であることから、生体内で生成した微粒子と考えられた。生成メカニズムとしてはチタンインプラントから微量溶出したチタンが生体内で酸化され、安定な二酸化チタン（anatase）に変化したものと推測され、生体内で金属酸化物ナノ微粒子が生成する例として、興味深い。但し、このanataseナノ微粒子が存在した患者のインプラント自体は良好な結果が得られており、組織中にチタンやanataseが存在しても、インプラント

の成否には無関係と考えられる。また人工関節周囲からはサブミクロンの金属摩耗粉が観察され、関節における金属同士の摩耗により発生する微粉末の形態が明らかになった。

またNi-Ti合金の水素チャージにより水酸化ニッケル様の微粒子が生成することが判明した。水素発生は生体内での金属腐食時にも起こる可能性があり、Ni-Ti合金の生体内での挙動を水素脆化の観点から見直す必要があると考えられた。

また、透過電子顕微鏡用雰囲気制御セルを試験的に歯科材料である石膏の観察に応用し、温度や雰囲気（高真空～大気）で変質しやすい生物系試料を大気雰囲気中で高分解能透過電子顕微鏡観察を可能にする点で極めて有用な装置と評価された。

E. 結論

生体内で歯科用インプラントや人工関節周囲から数十nmからサブミクロンの酸化物や金属微粒子が観察され、生体内で発生する各種微粉末の形態が明らかになった。

またNi-Ti合金の水素チャージにより水酸化ニッケル様の微粒子が生成することが判明しNi-Ti合金の生体内での挙動を水素脆化の観点から見直す必要があると考えられた。さらに透過電子顕微鏡用雰囲気制御セルの生物系試料の透過電子顕微鏡観察における有用性も明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uo M., Asakura K., Yokoyama A., Ishikawa M., Tamura K., Totsuka Y., Akasaka T., Watari F.: X-ray Absorption Fine Structure (XAFS) Analysis of Titanium-Implanted Soft Tissue, Dental Materials Journal, 26, 268-273, 2007

2) Uo M., Kachi H., Akasaka T., Watari F., Sato Y., Motomiya K., Tohji K.: The purity and thermal stability in air of metal-encapsulating carbon nanocapsules (MECNCs), Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures, 15, 303-309, 2007

2) ○ Uo M., Akasaka T., Abe S., Watari F., XAFS analysis of Ti, Ni-Ti and SUS304 implanted rat soft tissues, International Dental Materials Congress 2007, Abstract of IDMC2007, p.340 (Bangkok, 2007/11)

2. 学会発表

1) ○ Uo M., Asakura K., Watari F., Chemical state analysis of titanium and nickel in the surrounding tissues of metallic implants, 9th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation, Abstract of BSR2007, p.96 (Manchester, 2007/8)

3) ○宇尾基弘・阿部薫明・赤坂 司・亘理文夫, カーボンナノチューブ膜の作製と物性, 第49回日本歯科理工学会学術講演会(札幌, 2007年5月12,13日), 歯科材料・器械, 26(2), p.195, 2007

表1 人工関節周囲組織中の金属元素濃度 (単位: ppm)

元素濃度 (ppm)	Co	Cr	Ti
試料A	530	8.6	14
試料B	1060	1.6	420

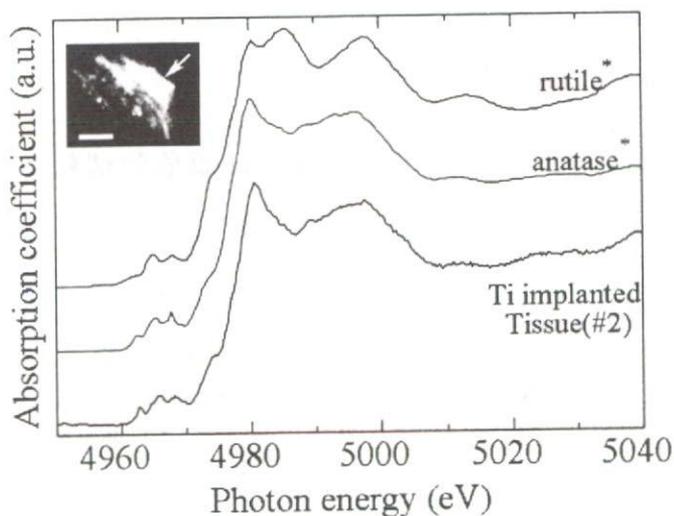


図1 Ti含有組織のTi K-edge XANESスペクトル

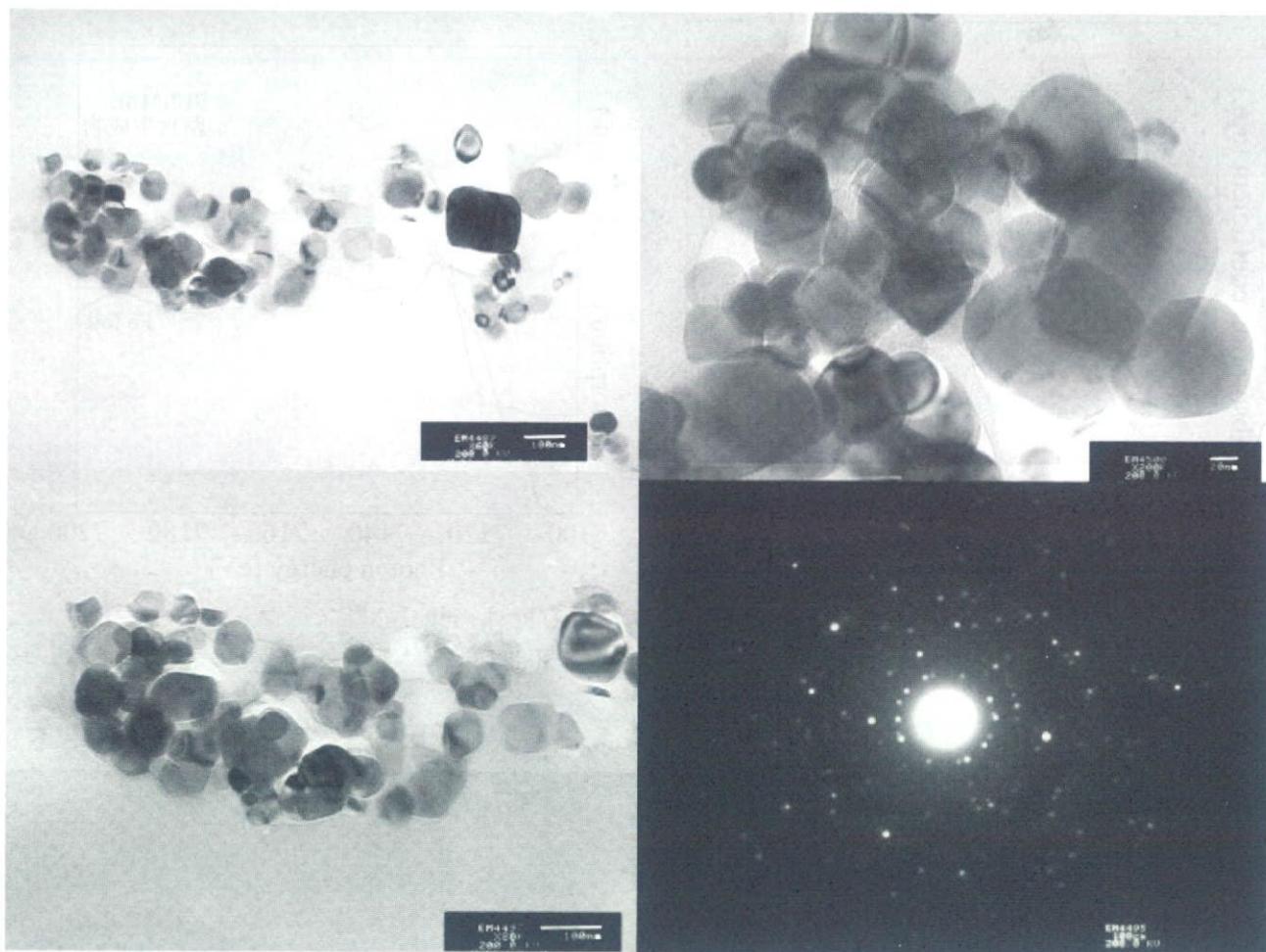


図2 歯科用インプラント周囲組織中の酸化チタン微粒子のTEM像

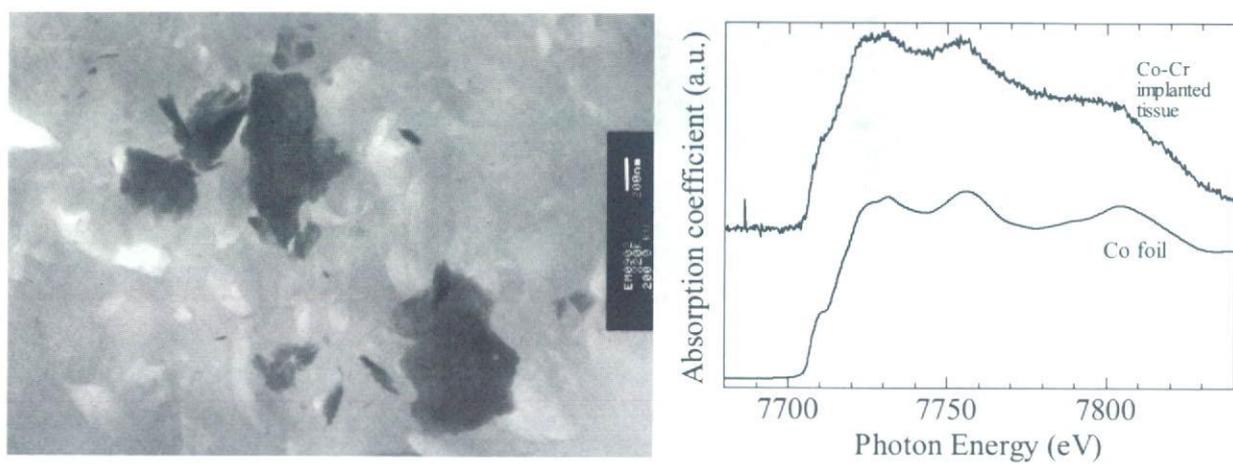


図3 試料A中の金属微粒子のTEM像とCo K-edge XANESスペクトル

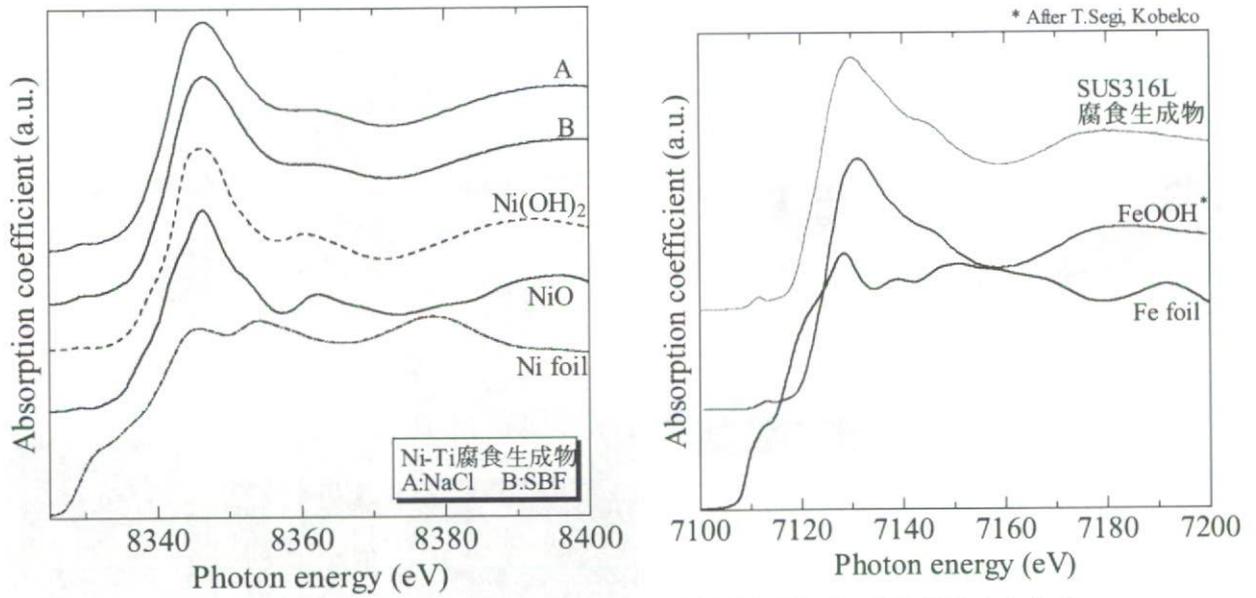


図4 水素チャージ後の生成微粒子のNi及びFe K-edgeXANESスペクトル
(左：Ni-Ti合金、右：SUS316L)



図5 普通石膏の真空下、126℃でのTEM像



図6 普通石膏の大気環境下、室温でのTEM像

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

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

主任研究者 巨理 文夫

研究協力者 水野 峰男

研究協力者 橋本 雅美

北海道大学大学院歯学研究科教授

(財団法人ファインセラミックスセンター
材料技術研究所 主席研究員)

(財団法人ファインセラミックスセンター
材料技術研究所 副主任研究員)

研究要旨

超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)の耐摩耗特性を、タンパク質量の異なる2種類の牛血清中にて、ヒップシミュレータを用いて評価した。500万回までの試験を行った結果、UHMWPEライナーの摩耗特性は血清の種類により大きく異なり、Alb/G比が大きく、コレステロール濃度が大きい程、ライナーの重量減少は小さいことがわかった。摩耗粉の数および面積に関しては、耐摩耗性の低いものの方が数および面積が大きかった。

摩耗粉の形状に関しては、耐摩耗性の高いUHMWPEカップの場合には、10 μm以上の粒径で繊維状のもの(アスペクト比が0.1程度と小さい)の面積割合が高かった。耐摩耗性の低いUHMWPEカップの場合には、粒径が10 μm以上のものは存在せず、1 μmのものが最も多く、粒径が増加するほどその存在割合は減少する傾向を示した。

A. 研究目的

人工関節置換手術は、機能を喪失した関節を人工関節に置換し、関節機能の再建を図る手術である。今日では、人工股関節、人工膝関節を始めとして多種類の関節に対して臨床応用され、変形性関節症、関節リウマチ、外傷などで患者の荒廃した関節の疼痛を寛解し、よりよいADL (activity of daily living) ・ QOL (quality of life) の獲得に大きな役割を果たしている。とくに我が国のような高齢社会では有病者が増加し、例えば人工股関節については、日本だけでも年間7万件以上の手術が行われている。しかし、その耐用年限(寿命)は一般的に約10年とされる。

人工関節の寿命を決める主因は、骨に固定された人工関節の部品の周囲に骨吸収が起き、固定性が失われること(弛み: loosening)である。looseningを

生じた人工関節は加速的に周囲の骨を吸収し、患者のQOLを著しく低下させる。このため入れ替え(再置換術)が必要となるが、再置換術は難度が高く、長期の入院を要する。社会の高齢化とともに、人工関節を入れた患者のその後の人生は長期化している。すなわち人工関節を入れた患者は再置換術の潜在的な対象であり、生涯に数回の再置換手術が必要となるため、その件数は今後飛躍的に増加し続けることが予想される。

Looseningは関節摺動面を構成するポリエチレン(PE)の摩耗粉をマクロファージ(Mφ)が貪食して液性因子を分泌し、これが破骨細胞の形成・活性化を促進して人工関節周囲の骨吸収が生じる結果として発生する。したがって、人工関節の弛みの原因であるポリエチレン摩耗粉と生体毒性の関係を調べ

ることは重要である。

現在、人工股関節の摩耗特性はヒップシミュレータを用いて、牛血清中にて評価することがISO14242-1で決められている。特に、牛血清は製造元やロットによりタンパク量が異なるために、潤滑液として用いることに疑問視する意見も多い。そのため、人工股関節の摩耗特性を正確に評価するためにも、まずは、牛血清中での摩耗特性および摩耗粉の評価を行い、特性の違いを明確にする必要がある。

そこで本研究では、まず、ヒップシミュレータを用い、市販材のUHMWPEライナー表面の耐摩耗性試験をタンパク質量の異なる牛血清中で評価し、摩耗特性および発生した摩耗粉の形態解析を行うことを目的とした。

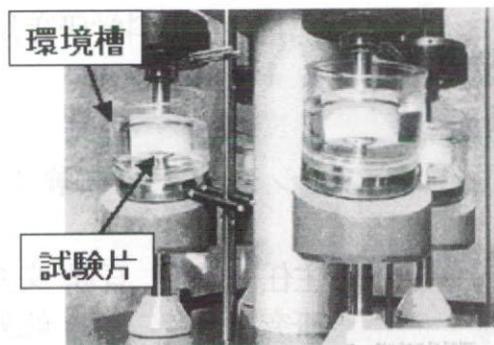
B. 研究方法

摩耗試験は、図1に示すMTS社製のヒップシミュレータ (Multi- Station Hip Simulator) を用いて行った。

ヒップシミュレータを用いた摩耗試験の試験条件は、ISO 14242-1に準じ、潤滑液には0.1%のアジ化ナトリウム (NaN₃) と20 mMのエチレンジアミン四酢酸三ナトリウム (3Na-EDTA) を含有する2種類の25%牛血清(表1)を用い、液量約750 mlで、毎秒1回の歩行周期 (1 Hz)に183 kgfと280 kgfの2つのピークをもつDouble Peak Paulの歩行条件(図2)で、最大500万サイクルの摩耗試験を行った。



(a) ヒップシミュレータ全体像



(b) 試験片と環境槽

図1 シミュレータの外観

摩耗試験に関しては、50万サイクル毎に潤滑液の交換を行うと同時に、ライナーの回収、洗浄、乾燥、重量測定を行い、ライナーの乾燥重量の変化から摩耗量を計測した。

表1 摩耗試験に使用した血清の成分量

血清種類	(mg/ml)				
	全タンパク量	アルブミン	γ-グロブリン	Alb/G	コレステロール
A	18.3	8.4	3.8	0.85	0.91
B	15.5	7.8	1.4	1	1.99

Na, P, Cl, Ca と P 濃度：血清 A ≒ B

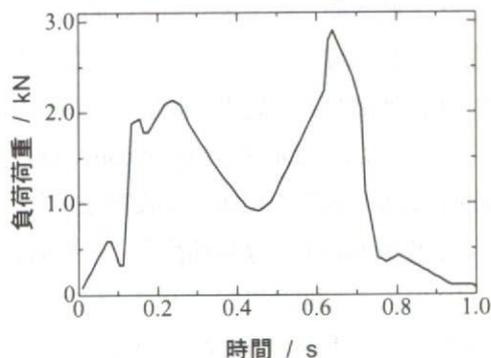


図2 荷重波形

試験部材のライナーには、市販のUHMWPEを使用した。試験部材の骨頭には、直径26mmの二酸化ジルコニウム製(ZrO_2)骨頭を使用した。

潤滑液は50万サイクル毎に交換し、摩耗粉回収のために試験液を全量回収した。

試験液からの摩耗粉の抽出方法は、図3に示す通り、試験後の潤滑液750mlから10mlを採取し、これに5.0N-NaOHを加え蛋白を溶解し、遠心分離装置(himac, CP70MX, 日立工機(株))により蛋白成分を除去し、その上澄み液をメタノールで2回洗浄後、さらにイソプロピルアルコール/蒸留水混合液中に分散させ、最終的に0.1 μ mのフィルターを用いて、摩耗粉をろ過抽出した。

摩耗粉の形態観察に関しては、500万回試験後の潤滑液から摩耗粉を抽出し、走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。コンピューター支援による画像解析を用いて、その形状や粒径分布の定量的評価を実施した。

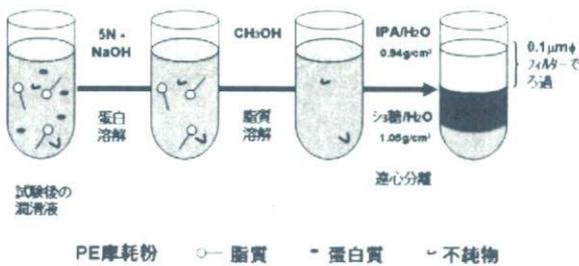


図3 摩耗粉の抽出方法

C. 研究結果

UHMWPE ライナーの摩耗特性は血清の種類により大きく異なり、Alb/G比が大きく、コレステロール濃度が大きい程(血清B)、ライナーの重量減少は小さいことがわかった(図4)。具体的には、初期摩耗率および定常摩耗率は、血清Aの場合、それぞれ27.9および41.41 mg/10⁶ cyclesであるのに対し、血清Bの場合には、それぞれ16.93および12.82 mg/10⁶ cyclesであった。一方、骨頭の摩耗率は、血清AおよびB

の場合、それぞれ0.13および0.02 mg/10⁶ cyclesであった。血清B中での骨頭重量の増加は、血清中の成分が骨頭表面に吸着したためと考えられる。

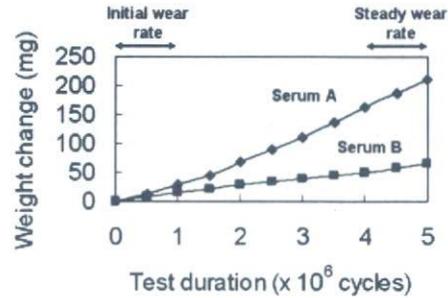


図4 牛血清AおよびB中におけるUHMWPEライナーの重量減少量

次にヒップシミュレータによる ZrO_2 骨頭とUHMWPEの組合せの摩耗試験において発生した摩耗粉のSEM写真を図5に示す。

試験を500万回行った血清A中でUHMWPEライナーから発生した摩耗粉の場合、顆粒状および比較的大きいねじれた繊維状のものが多く観察された。また摩耗粉量も多かった(図5下)。

一方、血清B中でUHMWPEライナーから発生した摩耗粉の場合、繊維状と顆粒状のものが混在していたが、顆粒状の摩耗粉に比べて繊維状の摩耗粉の方が多く観察された。また、その個数は、血清Aと比べると少なかった。

表2に血清AおよびB中で発生した摩耗粉の数および面積を示す。血清A中で発生したUHMWPE摩耗粉の個数および面積とも、血清B中で発生したそれよりも多かった。この結果は、図4の摩耗特性の結果と一致していた。