

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

チタン合金の体内機能劣化と微粒子生成に関する研究
分担研究者 浅岡憲三 徳島大学
大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授

研究要旨 チタン系医用合金の水素脆性による機能低下、遅れ破壊およびそうした現象に付随して生じる微粒子について研究を進めた。すなわち、水素は合金中に容易に侵入し、金属組織を変化させる特殊な元素であり、生体内でも水素がチタン系機能合金の機能低下、合金強度、寿命の低下、腐食と腐食物としてのマイクロ・ナノ粒子の生成促進に重要な役割を果たしている。チタン合金の機能低下速度が、化学的環境、応力あるいはひずみの状態との関係で決まることを定量的に測定した。ここでは、医療の場で利用されている Ni-Ti 超弾性合金が、応力、ひずみが加えられた状態に体内にあることを考慮し、合金の組織と水素吸収の関係、腫瘍や粘膜疾患による pH の変化が合金の腐食機構に及ぼす影響について検討した。

その結果、チタン合金の水素吸蔵の過程で発生する水素化物の腐食生成物であるマイクロ・ナノ粒子が移植デバイス周囲の生体組織の悪性腫瘍、粘膜疾患の発症に関与する可能性が見いだされた。

A. 研究目的

チタン系合金では、水素トライボロジーと水素脆性が問題になっている。生体材料としての応用分野では、前者は人工関節の摩耗粉の問題として、後者はデバイスの遅れ破壊、機能低下の問題として臨床報告されている。人工骨におけるインプラントの脱落については、骨とインプラントとの弾性係数など力学的な性質の著しい違いや材料の構造設計が原因であるとの報告が多くなされてきた。しかし、最近では、摩耗粉の生体反応として捉える考え方が、一般的になりつつある。すなわち、人工関節の摺動部で発生する摩耗粉が拡散し、周囲組織中のマクロファージに貪食される。摩耗粉を貪食したマクロファージが産生するサイトカインの働きにより、骨のリモデリングに係わる破骨細胞、骨芽細胞の活性が変化し、骨融解が生じる。そして、骨と人工骨の間に弛みが生じ、インプラントの脱落に繋がるという仮説であり、その検証が多く立場から進められている。ここでは、摩耗粉が重要な役割を果たしており、微

粒子の生体反応に関する研究が注目されている。

我々は、摩耗粉に相当する微粉末は、インプラントからのイオンの溶出、腐食と関係して生じる腐食生成物と関係して生じる可能性を検討してきた。その結果、チタン合金インプラントの水素吸蔵と関係して微粉末が生じることを実験的に検証した。

B. 研究方法

図1に示すように、白金を陽極に合金試料を陰極として直流電気を流すと、試料表面から水素が発生する。チタン系合金は水素吸蔵合金であるところから、合金はこの水素の一部を取り込む。そこで、電流または電圧とチャージ時間を制御することにより、合金中への水素チャージ量が制御できる。例えば、Ni-Ti 超弾性合金 (55 mass %Ni-Ti) を試料として、流す電流を $1\text{A}/\text{m}^2$ から $10\text{A}/\text{m}^2$ まで変化させて、24 時間チャージした後に合金を引張試験すると、図2に示すように、顕著な合金の機械的性質の低下が測定される。また、合金の破面を調べると、図3に示

すように、未処理の合金(c, d)では典型的な延性破面を呈しているが、 $1A/m^2$ で120時間水素をチャージした合金(e, f)では水素脆性破面を呈し、歯科矯正用線材として利用されたNi-Ti超弾性合金の破折症例(a, b)の破面とよく似ていた。また、この破面観察から、合金の腐食生成物が微粉として、口腔内に発散した可能性が示唆された(Biomaterials 22(2001)2257-2262)。

本研究では、生体内で利用されたときの、合金の応力(ひずみ)状態と機能劣化速度の関係、生体内に腫瘍や炎症があり合金周囲の化学的環境が変化したときの合金の機能低下速度について検討した。

実験1: Ni-Ti超弾性合金(55 mass %Ni-Ti)の生体内での機能劣化を調べる目的で、0.9%NaCl溶液中で2時間 $10A/cm^2$ の電流を流して水素をチャージした。合金を大気中に10日間放置した後に、昇温脱離分析法による水素量の測定、X線回折法(XRD)、引張試験により、合金中の水素量、合金表面の生成物、機械的性質を調べた。

実験2: Ni-Ti超弾性合金の使用条件と水素吸収速度の関係を知るために、実験1と同じ合金を $25\pm 2^\circ C$ の下で、50mmの部分で150mlの0.9%NaCl溶液に浸漬し、合金のひずみ状態を変化させて、2時間 $10A/cm^2$ の電流を流して水素をチャージした。水素チャージ後の合金中の水素量を測定し、合金の相変態と水素吸収速度との関係を調べた。

実験3: 実験1と同じ合金を、炎症による化学種の変化を想定し、0.9%NaCl溶液に1% H_2O_2 を加えた溶液に浸漬した。溶液中の合金に一定応力を負荷し、腐食破断するまでの時間を測定した。破断面の観察、腐食破面の解析、溶出イオンの測定から、合金の機能劣化を評価した。

実験4: 実験1と同じ合金を試料として、0.9%NaCl溶液中で10Vの電圧で電流を24時間流し、合金に水素をチャージした。チャージ後の水溶液中に生じた腐食生成物の粒度を分析し、Ni-Ti合金の腐食により、イオンの溶出と生成微粒子の粒度を調べた。

C. 研究結果

1) 実験1: 合金中の水素量は、水素チャージ前は10

mass ppmであった。水素をチャージした直後では212 ppm、24時間放置後でも204 ppmであった。図4にNi-Ti合金表面のXRDパターンを示した。水素をチャージすることにより、合金表面に水素化物が形成されたが、10日間大気中に放置した試料では水素化物が消失していた。この結果から、大気中に放置することで、水素が合金内部に拡散していることがわかった。

Ni-Ti超弾性合金の変形は、ステージI:母相(B2)の弾性変形、ステージII:マルテンサイト変態、ステージIII:マルテンサイト(B19')の弾性変形、ステージIV:マルテンサイトの塑性変形よりなる。こうした各ステージの変形への水素の影響について調べた結果を図5に示した。すなわち、各変形ステージまで合金にひずみを与え、その後除荷した。その結果、水素チャージした直後の試料では、マルテンサイト変態終了後の塑性変形中に合金は破断したが、大気中に放置し水素が拡散すると、超弾性の性質が復元することが確認できた。

実験2: 図6にNi-Ti超弾性合金にひずみを与え、その状態で $10A/m^2$ の電流を2時間流して水素を吸収させた後、合金中の水素を測定した結果を示した。その結果、オーステナイト相よりもマルテンサイト相の方が水素吸収量は多いことが明らかになった。

実験3: 1% H_2O_2 が加えられた0.9%NaCl溶液中で、Ni-Ti超弾性合金に一定応力を負荷し、合金の腐食寿命を測定した結果を図7に示した。ここでの結果から、マルテンサイト相の合金は応力腐食寿命が短くなることがわかった。図8-1に、負荷応力が450MPaと900MPaのときの破断面のSEM写真を示した。ここで示されているように、低応力の場合には、かなりの程度腐食が進行してからクラックの進展が生じることが推定され、高応力が負荷されたときには、局部的な腐食によるクラックの発生が進展して破断に至っていることがわかった。腐食領域以外の破面は延性破面に近い様相を呈していた。試料側面を観察したSEM像を図8-2に示した。低応力で破断した試料では、クレータ上の腐食域が観察され、大動脈中に移植されたNi-Ti合金のステントで見られる腐食パターン(J Endovasc Ther 8(2001)248-253)によく似た様相であった。図9に試料から溶出したNi

および Ti イオンの ICP での測定結果を示した。Ni イオンが Ti イオンに比べ優先的に溶出していることがわかった。また、溶液浸漬後の XPS 解析からも Ni イオンの溶出が推定できた。ここでの溶液浸漬により合金表面の元素分布を AES で調べた結果からは、図 10 のように、表面酸化膜が厚くなっていること、酸化膜中の Ni イオンが低くなっていることが明らかになった。

実験 4：電気を通電中の電極および試料、通電停止後の状態を図 11 に示した。通電中の試料表面からは、水素が発生している。そして、停止後の試料表面には、溶液中で生じた腐食生成物が試料表面に付着してきた。時間の経過とともに腐食生成物は溶液中に飛散し、溶液中に微粒子が浮遊し始めた。その後、試料および電極を除去し、容器内で溶液を十分に攪拌して、腐食性生物の粒度を測定した結果を図 12 に示した。ここで示されているように、溶液中には 10 nm ~ 100 nm の微粒子と μm および 100 μm 程度の大きな粒子が生じることがわかった。今後、電気化学的条件、溶液の化学種、合金組成、実験の物理的条件との関係で、Ni-Ti 合金の水素吸収と関係して生じる微粒子について調べる予定である。

D. 考察

Ti 系合金は、特異な力学的挙動を発現することから、歯科、骨格系のみならず消化器系、循環器系、泌尿器系、呼吸器系の検査、移植機器として利用され始めている。すなわち、カテーテル、ステント、クラッチ、アクチュエータ、バルブ、ガスケットとして体内の計測器、移植材料、治療機器に不可欠な素材となっている。とくに、Ni-Ti 合金は形状記憶、超弾性などの特性をもつことから、注目されている。

物性の特徴を整理すると、Ni-Ti 合金は、図 13 に示すような温度に依存した相変態をする。すなわち、オーステナイト相の合金を冷却すると、マルテンサイト変態を生じ、マルテンサイト相となる。低温のマルテンサイト相の合金を加熱すると、逆変態し、オーステナイト相となる。マルテンサイト相の合金を変形し、オーステナイトに逆変態させると合金は変形前の形状に復帰することから、この合金は形状記憶合金と呼ばれている。

本実験では、表 1 に示す変態温度の合金を試料と

した。この変態温度は、合金の純度、合金組成を変えること、微量添加元素を添加することで変えることができる。

オーステナイト相の合金を引張るとある応力状態でマルテンサイト相変態が生じ、ひずみが一定の状態に変態が進行する。合金がマルテンサイト相になった後、合金は弾性変形そして塑性変形を生じて破断する。各ひずみの状態で力を除荷すると、図 5 に示すようにひずみが回復する。こうした変形が超弾性変形と呼ばれている。

こうした Ni-Ti 合金を医療の中で利用するには、生体安全性が重要な問題である。こうしたことから、多くの研究者によりイオンの溶出、生体親和性について調べられてきた。われわれは、世界ではじめて水素吸蔵合金であることに着目し、水素吸収と形状記憶、超弾性機能の低下、それにともなう腐食現象、腐食生成物の粒度、化学組成に着目した研究を展開した。こうした研究は、医療用機器として利用するときの寿命、破壊そして生体安全性評価の基本的問題である。今後、生体内での合金機能の低下と付随して生じる腐食生成物とその生体安全性に焦点を絞り、研究を進める予定である。

E. 結論

Ni-Ti 超弾性合金は、生体内環境で水素が関与した機能劣化が生じる。この機能劣化は、合金の機械的性質の劣化、強度、寿命の低下をまねく。他方、こうした力学的性質の低下は合金表面の局部腐食と関係しており、局部腐食によりイオンの溶出、腐食生成物の生成を促進する。ここで、生じる微粒子はナノ、マイクロ粒子であり、この微粒子が細胞や組織と反応して粘膜疾患や癌を発症する可能性が危惧される。今後、微粒子の発生機構、発生する微粒子の化学組成、粒度の同定、そして微粒子と細胞との相互作用、相互作用の結果として生じるサイトカイン、細胞外マトリックスへの関与について調べていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomita M, Yokoyama Asaoka K, Sakai J: Hydrogen thermal desorption behavior of Ni-Ti superelastic alloy subjected to tensile deformation after hydrogen charging. *Materials and Engineering A*, 476, 308-315, 2008.
2. Yokoyama K, Ogawa T, Takashima K, Asaoka K, Sakai J: Hydrogen embrittlement of Ni-Ti superelastic alloy aged at room temperature after hydrogen charging. *Materials Science and Engineering A*, 466(1-2)106-113, 2007.
3. Yokoyama K, Ogawa T, Fujita A, Asaoka K, Sakai J: Fracture of Ni-Ti superelastic alloy under sustained tensile load in physiological saline solution containing hydrogen peroxide. *Journal of Biomedical Materials Research A* 82A(3)558-567, 2007.
4. 浅岡 憲三 : チタンのキャラクタリゼーションと生体内での遅れ破壊, *歯科材料器械*, Vol.26, No.4, pp.334-339, 2007
5. Asaoka K: Effects of surface oxide films on hydrogen absorption and mechanical properties of titanium, *Dentistry in Japan*, Vol.43, pp.99-103, 2007
6. Takashima K, Yokoyama K, Asaoka K, Sakai J: Effects of potential on hydrogen absorption and desorption behaviors of titanium in neutral fluoride solutions. *Journal of Alloys and Compounds* 431(1-2)203-207, 2007.
7. Yokoyama K, Tomita M, Asaoka K, Sakai J: Hydrogen absorption and thermal desorption behaviors of Ni-Ti superelastic alloy subjected to sustained tensile-straining test with hydrogen charging. *Scripta Mater* 57(5)393-396, 2007.

2. 学会発表

1. SH An, WJ Kim, Kenzo Asaoka, TY Kwon and Kyo-Han Kim : Heat-treated TiO₂ nanotubes: Hydroxyapatite growth, *International Dental Materials Congress 2007*, p.315, Bangkok, Nov. 2007
2. Kenzo Asaoka : Mechanism of delayed fracture of titanium implant in vivo, *International Dental Materials Congress 2007*, p.158, Bangkok, Nov. 2007.
3. Kenichi Hamada, Eiichi Honda and Kenzo Asaoka : MRI-Artifact-Free Gold Alloy for Biomedical Application, *International Dental Materials Congress 2007*, Bangkok, Nov. 2007.
4. Emi Fujiwara, Fumiaki Kawano, Kenichi Hamada and Kenzo Asaoka : Solubility of Strontium and Carbonate-substituted Calcium Phosphate Bone Cement Mixed with SrCl₂ Solution, *International Dental Materials Congress 2007*, Bangkok, Nov. 2007.

5. Yoshihito Naito, Kenichi Hamada, Daisuke Nagao, Yoritoki Tomotake, Tetsuo Ichikawa and Kenzo Asaoka : Bioactivity of Porous Titanium Produced Using Moldless Process, *6th International Symposium on Titanium in Dentistry*, Kyoto, July 2007.
6. Emi Fujiwara, Kenichi Hamada and Kenzo Asaoka : Effects of Calcium Concentration on Hydrothermal Surface Modification of Titanium, *6th International Symposium on Titanium in Dentistry*, Kyoto, June 2007.
7. Kenichi Hamada, Yoshihito Naito, Daisuke Nagao, Yoritoki Tomotake, Tetsuo Ichikawa and Kenzo Asaoka : Moldless Process of Producing Porous Titanium for Dental Applications, *6th International Symposium on Titanium in Dentistry*, Kyoto, June 2007.
8. Kenzo Asaoka : Stress-corrosion cracking of titanium (Ti) implants by hydrogen absorption, *Workshop on metallic corrosion of small implants*, Norfolk, May 2007.
9. Yoshihito Naito, Daisuke Nagao, Tetsuo Ichikawa, Kenzo Asaoka and Kenichi Hamada : High formable porous titanium for biomedical applications, *International Association for Dental Research*, New Orleans, March 2007.
10. Yoshihito Naito, Daisuke Nagao, Kenichi Hamada, Kenzo Asaoka and Tetsuo Ichikawa : High formability of newly developing biomedical porous titanium, *1st International Symposium and Workshop "The future Direction of Oral Sciences in the 21st Century"*, Awaji, March 2007.
11. Emi Fujiwara, Fumiaki Kawano, Kenichi Hamada and Kenzo Asaoka : Preparation of strontium-containing hydroxyapatite bone cements mixed with strontium, *1st International Symposium and Workshop "The future Direction of Oral Sciences in the 21st Century"*, Awaji, March 2007.
12. 藤原 江美, 河野 文昭, 浜田 賢一, 浅岡 憲三 : 高溶解型ストロンチウム含有炭酸アパタイトセメントの試作, 第29回日本バイオマテリアル学会, 349頁, 2007年11月.
13. 浅岡 憲三, 前島 邦光 : チタン表面のキャラクタリゼーション, 第29回日本バイオマテリアル学会, 223頁, 2007年11月.
14. 金村 篤謙, 横山 賢一, 浅岡 憲三, 酒井 潤一 : 過酸化水素含有生理食塩水中における Ni-Ti 超弾性合金の耐食性の向上, — 硝酸浸漬による表面改質 —, *日本金属学会 2007年秋季大会*, 2007年9月.
15. 長岡 彬, 横山 賢一, 浅岡 憲三, 酒井 潤一 : Ti 及び Ni-Ti 合金の表面改質に伴う水素吸収の評価, *日本金属学*

会 2007 年秋季大会, 2007 年 9 月.

16. 富田 美穂, 横山 賢一, 浅岡 憲三, 酒井 潤一: Ni-Ti 超弾性合金の水素吸収と昇温放出挙動に及ぼす繰返し変形の影響, 日本金属学会 2007 年秋季大会, 2007 年 9 月.
17. 内藤 禎人, 浜田 賢一, 市川 哲雄, 浅岡 憲三: モールドレス成形および焼成したチタン多孔体の基礎的評価, 第 49 回日本歯科理工学会学術講演会, 2007 年 5 月.
18. 藤原 江美, 河野 文昭, 浜田 賢一, 浅岡 憲三: スترونチウム含有炭酸アパタイトセメントの溶解性, 第 49 回日本歯科理工学会学術講演会, 2007 年 5 月.
19. 浜田 賢一, 浅岡 憲三: MRI アーチファクトフリー生体用合金の研究 (第 1 報) - 候補合金と基礎的評価 -, 第 49 回日本歯科理工学会学術講演会, 2007 年 5 月.
20. 浅岡 憲三, 宇尾 基弘, 亘理 文夫: チタン合金の水素吸蔵と溶出微粒子, ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチ

ューブのバイオ応用研究会, Vol. 5, 29 頁, 2007 年 12 月.

21. 浅岡 憲三, 浜田 賢一, 藤原 江美: チタンの表面処理とキヤラクタリゼーションの変化, ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会, Vol. 4, 2007 年 8 月.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案取得

なし

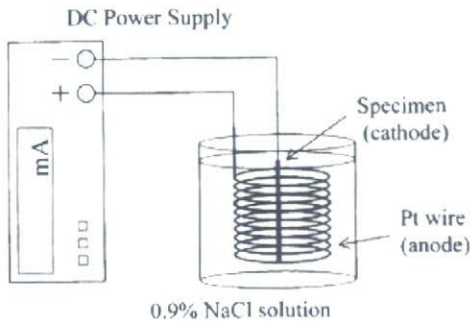


図1 水素チャージの方法

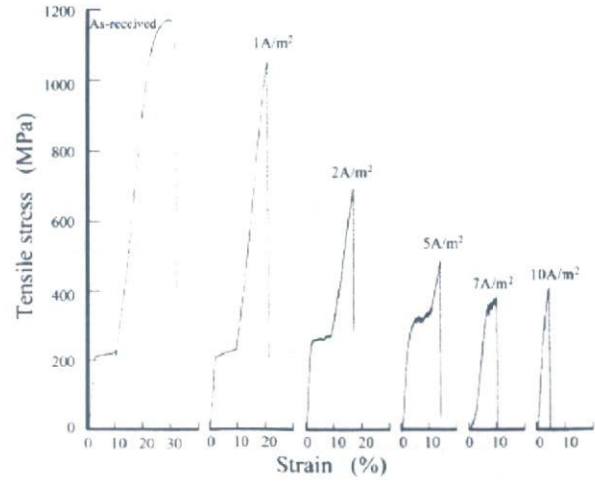


図2 図中の電流を24時間流して水素をチャージした Ni-Ti 合金の応力-ひずみ曲線

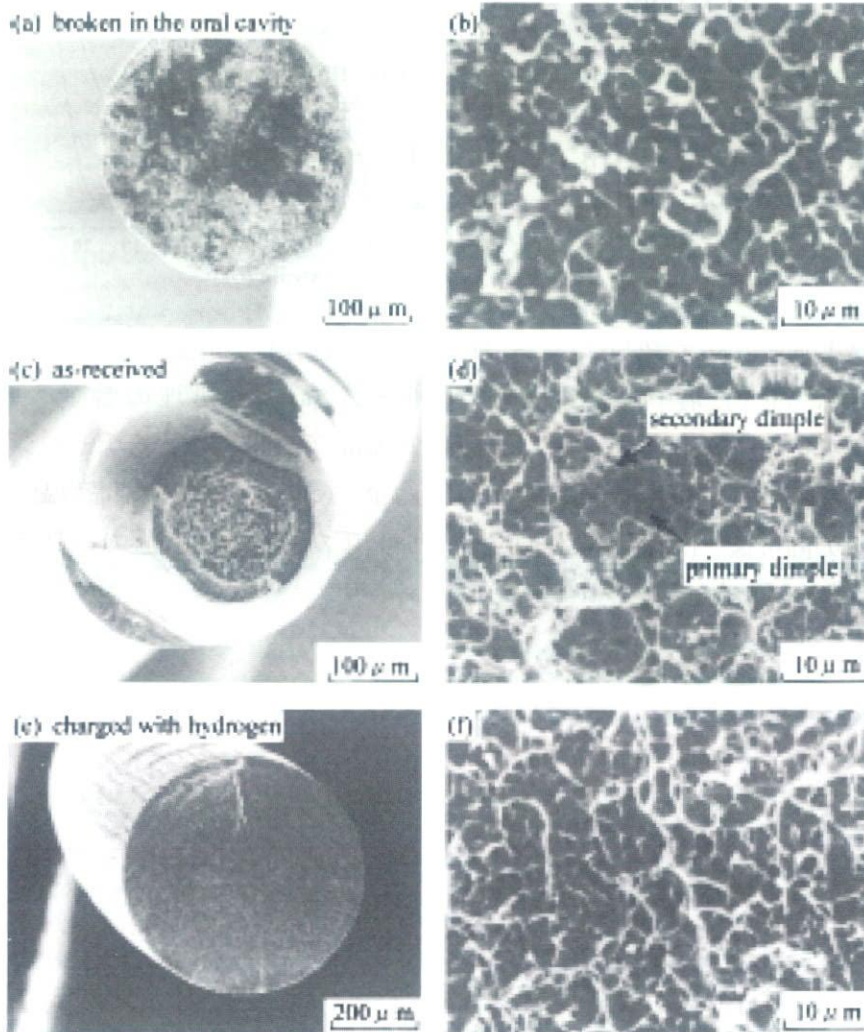


図3 Ni-Ti 合金の破面

(a), (b)
口腔内で破折した
歯科矯正用
Ni-Ti 超弾性線

(c), (d)
未処理の Ni-Ti
超弾性線の破面

(e), (f)
1A/m²で120時
間水素をチャー
ジした後、引張
試験した Ni-Ti
超弾性線の破面

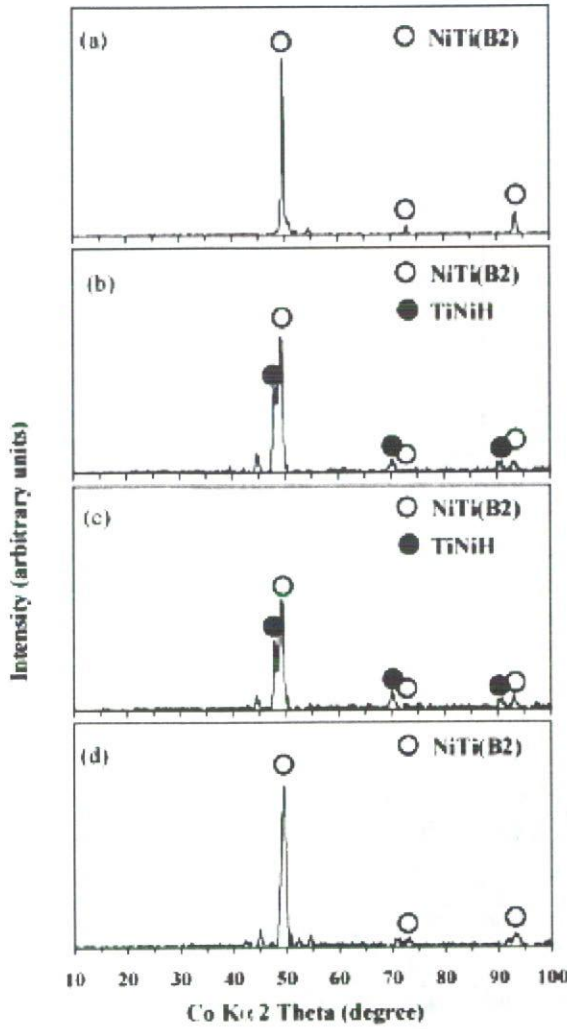


図4 X線回折像 (a)は未処理のNi-Ti超弾性合金線 (b)は0.9% NaCl溶液中で10 A/m²の電流を6時間流して水素をチャージした合金の表面 (c)は(b)を24時間室温に放置した後の回折像 (d)は240時間放置後の回折像

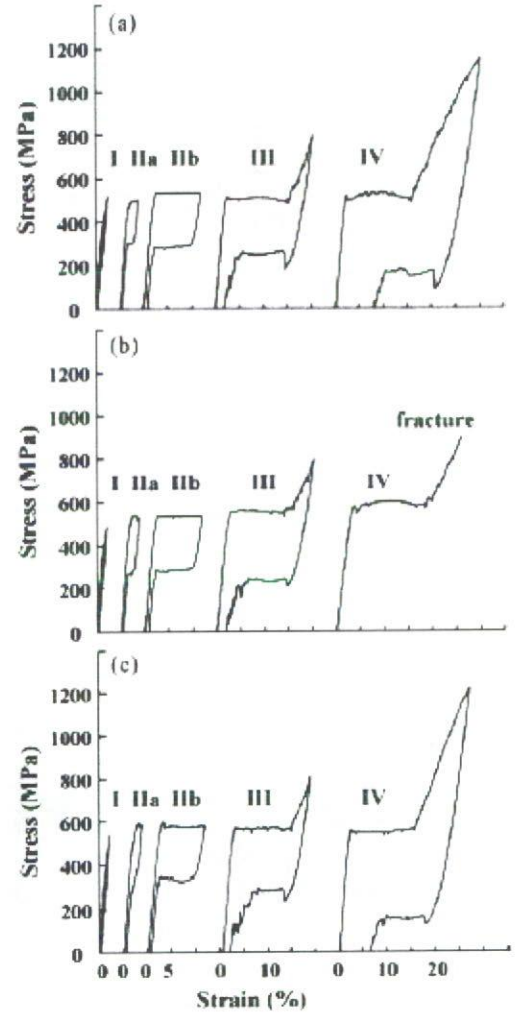


図5 Ni-Ti 超弾性合金線の応力-ひずみ曲線 (a)は未処理の合金 (b)は10 A/m²で2時間水素をチャージした合金 (c)は(b)を24時間室温中に放置してから測定した応力-ひずみ曲線

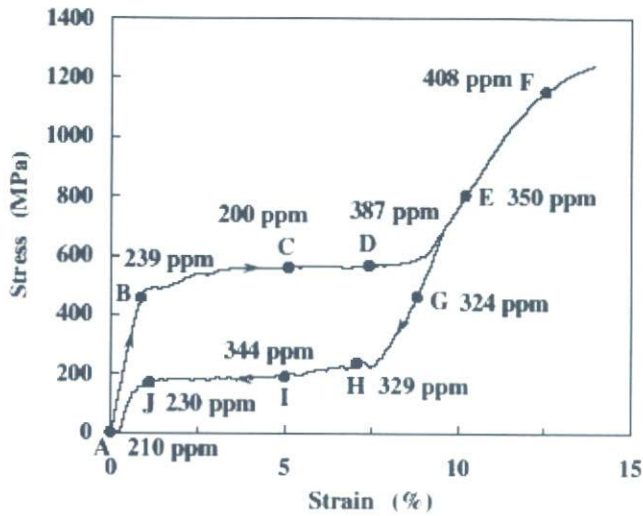


図6 Ni-Ti 超弾性合金にひずみを加えた状態で、 10A/m^2 の電流を2時間流し水素をチャージした後、昇温脱離分析法で1時間後に測定した水素量

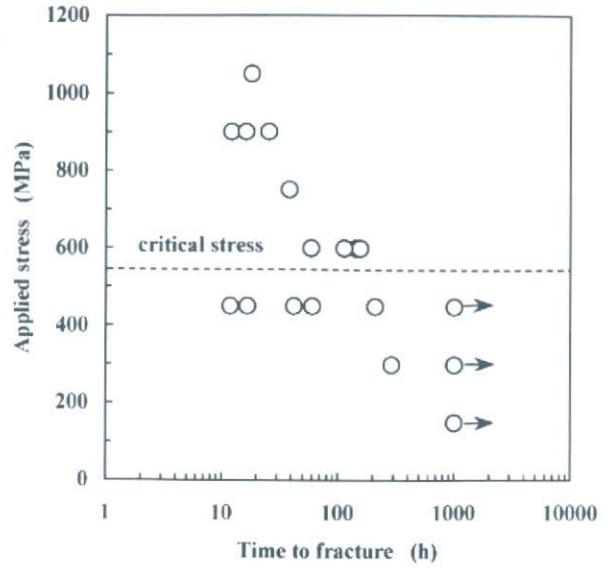


図7 Ni-Ti 超弾性合金に一定応力を加えながら 0.9% NaCl + 1% H_2O_2 溶液に浸漬したときに腐食破断するま

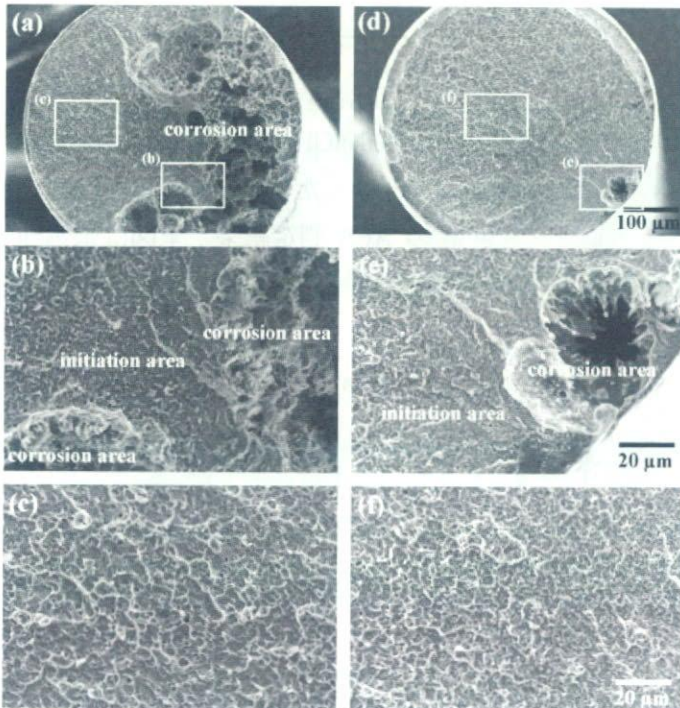


図8-1 加えた応力が450 MPa (a ~c)と900 MPa (d ~f)のときの腐食破面：上からマクロ破面、クラックの発生した場所、腐食していない部分

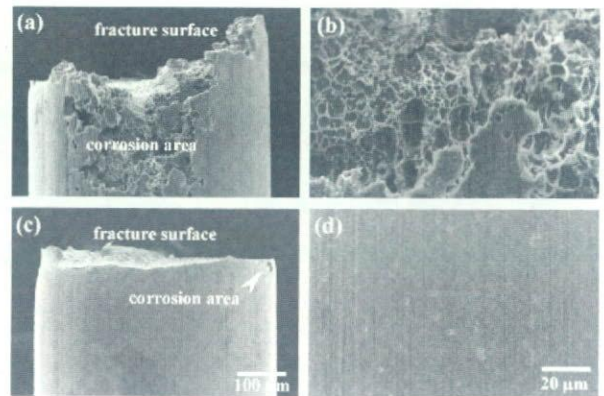


図8-2 450 MPaと900 MPaの応力加えたときの破断試料の側面：低応力ときには腐食領域が広い範囲に及んでいる

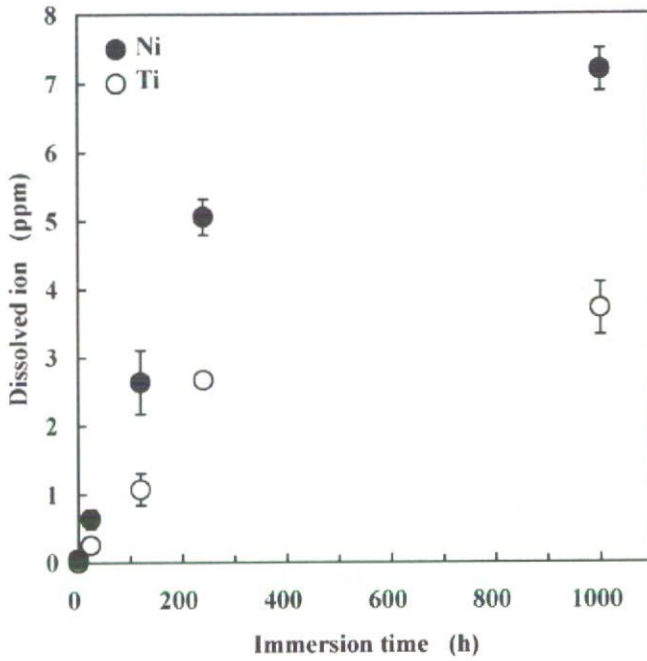


図9 Ni-Ti 超弾性合金から 0.9% NaCl + 1% H₂O₂ 溶液への溶出イオン (ICP の測定結果)

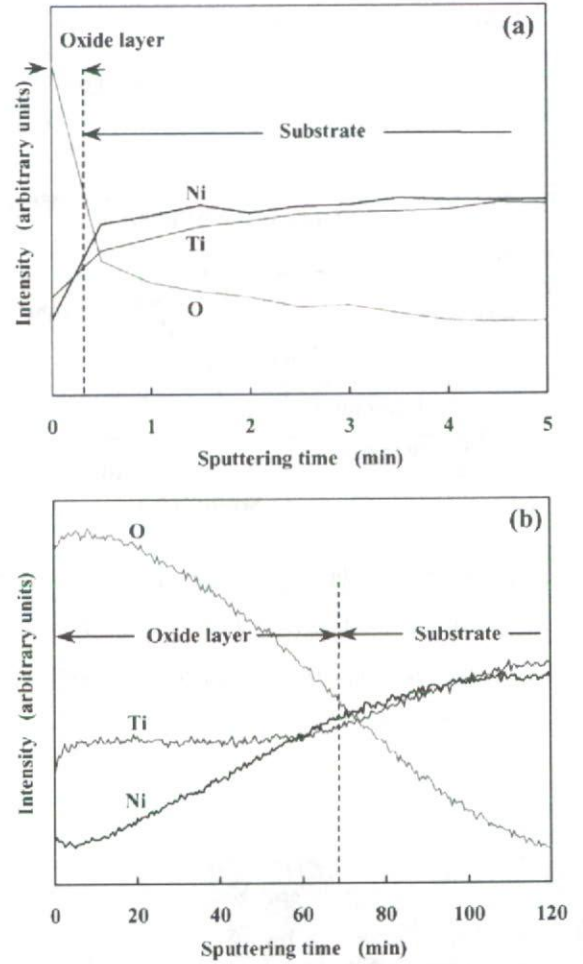


図10 0.9% NaCl + 1% H₂O₂ 溶液へ24時間浸漬した後の Ni-Ti 超弾性合金の AES 測定結果：上図は未処理の合金

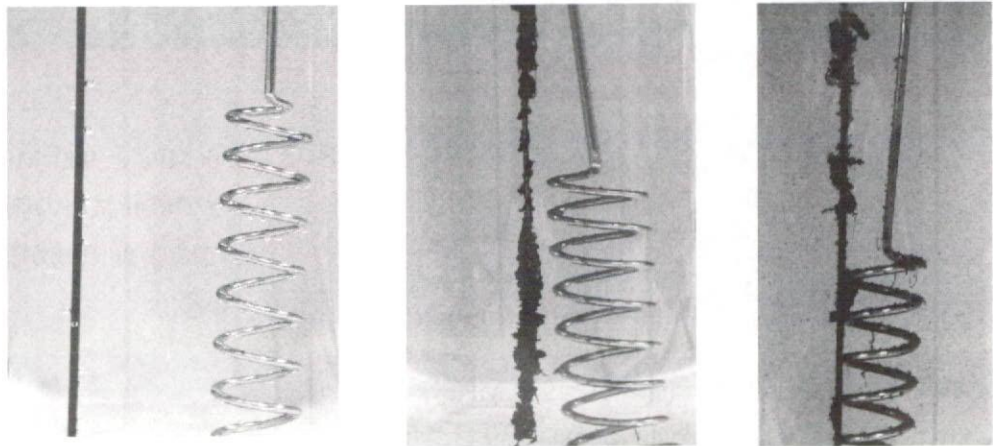


図11 Ni-Ti 超弾性合金を 0.9% NaCl 溶液中で24時間10Vの電圧で電流を流したときの腐食生成物の発生状況：左は通電中、中は停止1時間後、右は停止1日後

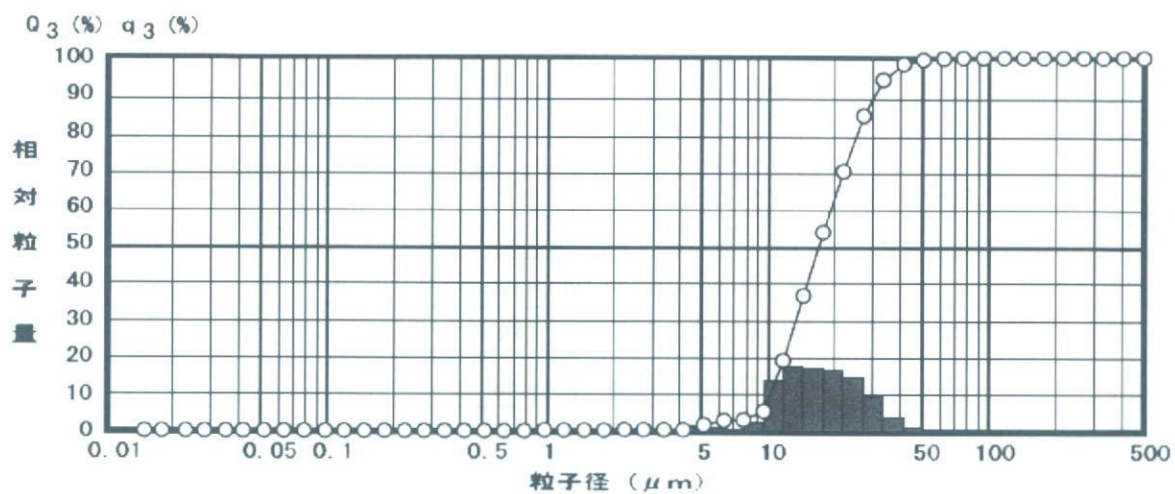
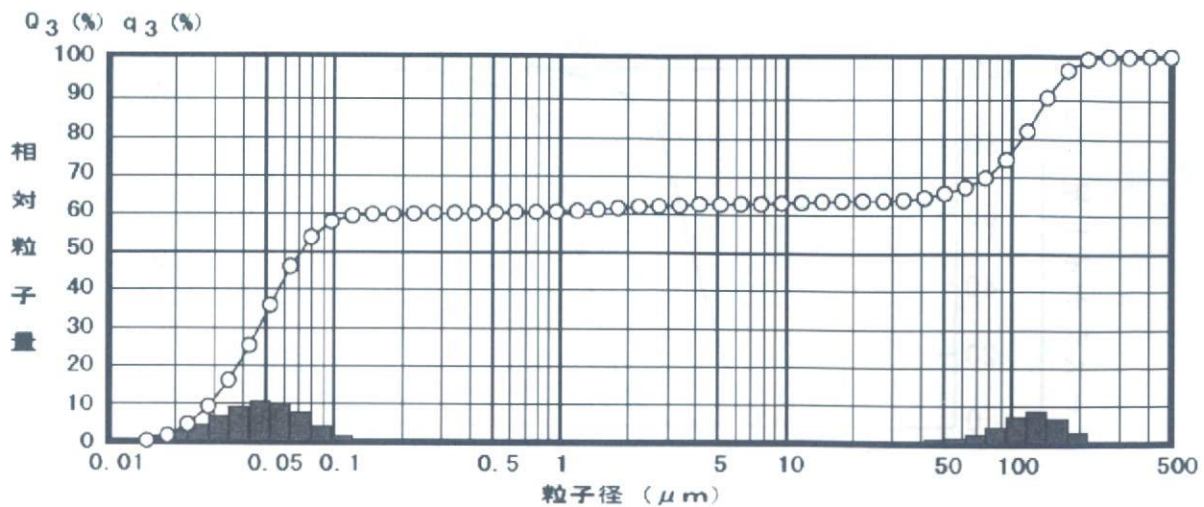


図1 2-1 Ni-Ti 超弾性合金を 0.9% NaCl 溶液中で 24 時間 10V の電圧で電流を流したときに発生した腐食生成物の粒度分布

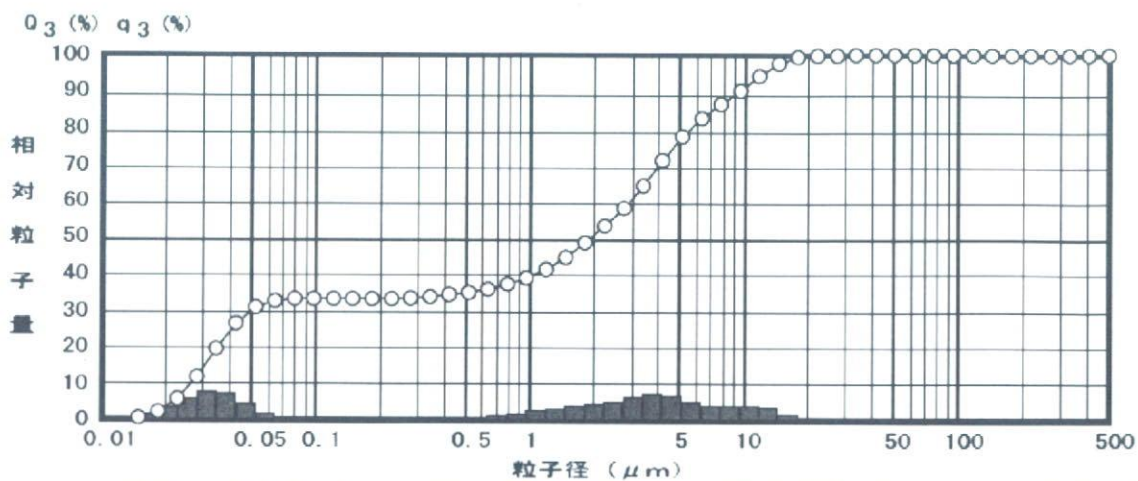


図1 2-2 Ni-Ti 超弾性合金を擬似体液中で 24 時間 10V の電圧で電流を流したときに発生した腐食生成物の粒度分布

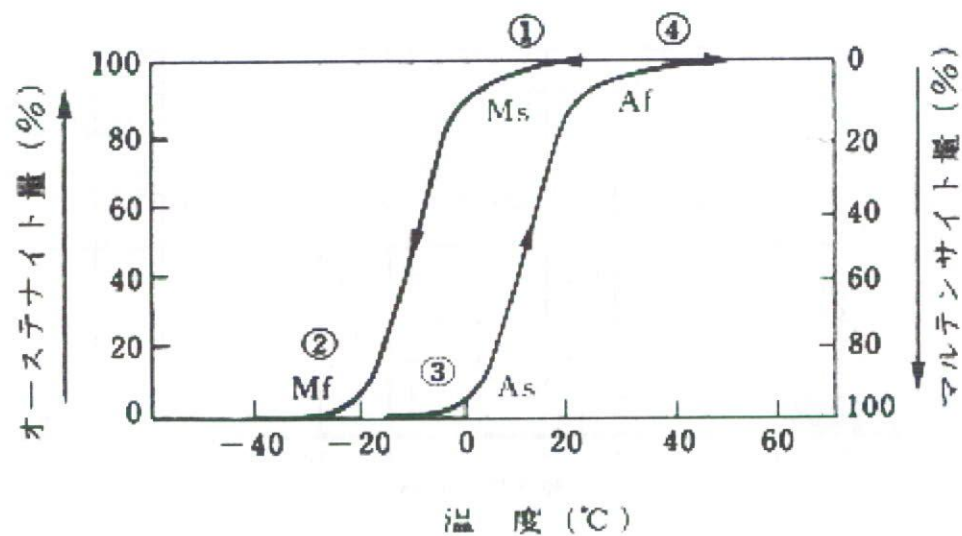


図1.3 Ni-Ti合金のマルテンサイト変態における変態温度のヒステリシス

表1 実験に用いたNi-Ti超弾性合金のマルテンサイト変態温度

Transformation Temperature (°C)			
Ms	Mf	As	Af
1.0	-40.5	-28.0	10.0

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

歯科診療時に生じる切削粉の観察とそれらマイクロ・ナノ粒子の体内動態
可視化法の検討に関する研究

分担研究者 森田 学
研究協力者 江崎光恵

北海道大学歯学研究科教授
北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 本研究では、歯科診療時に発生する切削粉が体内に取り込まれた際に生体に及ぼす影響を検討することを目的として人工的に作製した切削粉の形態観察を行い、更にそれら切削粉を始めとするマイクロ・ナノ粒子の体内動態可視化法の一つとして磁気共鳴画像法(MRI)の利用を試みた。

被研削材（ヒト抜去歯および歯科鑄造用金属）を回転切削工具により切削し、走査型電子顕微鏡及び粒度分布測定装置によって観察した。切削粉は被研削材と切削工具との組み合わせによって粒径・形状ともに大きく異なり、特に歯を切削した場合には平均粒径 $10\mu\text{m}$ 前後のものもあり、これらが生体内に取り込まれた場合の影響が懸念される。

またナノマグネタイトけん濁液をマウスに血中投与し、7テスラの動物用MRI撮像装置を用いて観察を行ったところ、特に肝臓、腎臓、脾臓において信号強度の低下が認められ、血行性にマグネタイトが各臓器に到達したことが示唆された。

A. 研究目的

歯科診療の現場では、歯質やレジン、金属、陶材など様々な材料を高速回転切削器具を用いて切削・研磨する。ほとんどの場合、これらの作業は口腔内で行われ、切削片や磨耗粉は唾液や水とともに口腔内に貯留することとなる。これらは口腔内バキュームによって吸引・除去されるが、その一部が嚥下などによって患者の体内に取り込まれることがある。歯科治療に用いられる材料にはアレルギーを誘発する物質も存在し、また、切削作業により器具そのものに刃こぼれを生じることもある。本研究では、これらの物質が体内に取り込まれた際に生体に及ぼす影響を明らかにするため、切削粉の観察を行った。また、それらマイクロ・ナノ粒子の生体内での動態の可視化法の一つとして、マウスに投与したナノ粒子の磁気共鳴画像法(MRI)による観察を試みた。

B. 研究方法

観察用の切削粉を得るため、抜去歯牙及び歯科用金属（歯科鑄造用金銀パラジウム合金：以下、金パラと表記）それぞれを、歯科用エアータービンと切削工具（通常切削用ダイヤモンドポイント：DP、カーバイドバー：WC）を用いて清潔なポリ袋の内部で切削した。発生した切削粉を水とともに回収し、得られた試料を島津 SALD-7000 粒度分布測定装置及び日立S-4000 走査型電子顕微鏡(以下SEM)を用いて観察した。以下、被研削材と切削工具の組合せを、歯/DP の要領で略記する。

マグネタイト粒子(粒径約 10nm、東北大院・田路研)のけん濁液をマウス (ICR 系オス 8-12 週齢) 尾静脈から血中投与を行い、7テスラの Varian INOVA 動物用磁気共鳴画像 (MRI) 撮像装置を用いて吸入麻酔下で撮像した。撮像条件は

TR/TE = 5000/20 ms, matrix 256 x 128, field of view 80 x 40 mm², スライス厚 1mm で行った。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、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。

C. 研究結果

切削粉のサイズと粒径は、切削工具と被研削材との組み合わせによって大きく異なった。図1に示すように、金パラ/DP では平均粒径 100 μm 程度の鉋屑状の切削片が多く見られた。金パラ/WC では、平均粒径は 100 μm 程度であるが不定形の切削片が観察された。一方、歯牙を切削した歯/DP の場合には、数〜数十ミクロン(平均: 10 μm 程度)の不定形の切削片に、更に細かな粒子が付着している様子が観察された。また、粒度分布測定を行った結果、同様の所見が認められた。図2にそのグラフを示す。

切削粉などのマイクロ/ナノ粒子が体内に取り込まれた際の体内動態可視化の手段の一つとして、MRI の利用を検討した。今回はマウス尾静脈よりナノマグネタイト粒子 (Fe₃O₄ 粒径約 10nm) を血中投与し、その体内での動態の追跡を行なった。図5に示すように、投与後に肝臓において輝度の低下が見られる。これはマグネタイトが血流に乗り肝臓へと到達したために、臓器周辺の MRI 信号強度が減少したことを示している。そのほか、脾臓や腎臓へもマグネタイトが到達した様子が観測されている。また、投与後数時間のうちに各臓器での MRI 信号強度が経時的に減少しており、マグネタイトが徐々に臓器へと到達している事が示唆された。

D. 考察

歯科診療時には今回観察したような切削粉が多量に発生し、その一部は口腔内バキュームによって除去できず、唾液や水とともに嚥下によって体内に取り込まれている可能性がある。また、生じた切削粉の一部はエアロゾルとなって診療室内に浮遊し、同じ室内にいる全ての人が吸入している可能性もある。過去の研究において、10 μm 以下の物質はその素材が何であるかに関わらず細胞刺激性を示すこと

が示唆されており、室内環境という観点からも呼吸器系に及ぼす影響について考慮する必要性を認める。

マイクロ/ナノ粒子の体内動態可視化の手段の一つとして、今回は MRI の利用を検討した。MRI 法の利点として、検査対象における試料の体内分布を 3 次元的な画像情報として得られること、同一の検査対象の経時的観察が可能であること、また、これらの情報が非侵襲的に得られること、などが挙げられる。マウス尾静脈より血中投与した結果、肝臓、腎臓、脾臓において経時的な信号強度の低下が認められ、マグネタイト粒子が血行性に臓器に到達する様子が観察された。今後はマウスの呼吸による体動や投与方法などの問題を解決しつつ、情報の高度化とより長期的な経時観察の実現を目指し、検討を行っていく。

E. 結論

歯科診療によって生じる切削粉が生体に及ぼす影響を明らかにし、また、そのようなマイクロ/ナノ粒子の体内動態を可視化する手段の一つとして MRI の利用を検討した。切削粉は切削工具と被研削材との組み合わせによって形状、粒径ともに大きく異なり、今後さらに吸入した場合の呼吸器系への影響などを考慮する必要がある。

MRI によるナノマグネタイトは、経時的観察により肝臓、腎臓に血行性に到達する様子が顕著に認められた。今後は MRI 装置の利点を生かした観察と投与方法やマウスの呼吸による体動などの技術的問題を解決を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimiya Nakamura, Yoshiaki Deyama, Yoshitaka Yoshimura, Kuniaki Suzuki, Manabu Morita: Toll-like receptor 3 ligand-induced antiviral response in mouse osteoblastic cells, *International Journal of Molecular Medicine* 12(11):535-540, 2007
2. Hirohisa Hongo, Hiroko Takano, Manabu Morita: Dense fibrial meshwork enhances *Porphyromonas gingivalis* adhesiveness: a scanning electron microscopic study, *Journal of Periodontal Research* 42(2):114-118, 2007

3. 高野知承, 竹原 順次, 森田 学. 非う蝕性歯頸部欠損と歯磨き習慣, 咬合力, 咬合接触面積および平均圧力との関係. 口腔衛生学会雑誌 57(5):613-621, 2007
4. 角館直樹, 須貝 誠, 藤澤雅子, 森田 学. 歯科医院における歯冠修復処置と定期歯科健診の歯科医業収支の比較. 口腔衛生学会雑誌 57(5): 640-649, 2007
5. Watari F., Abe S., Koyama C., Yokoyama A., Akasaka T., Uo M., Matsuoka M., Totsuka Y., Esaki M., Morita M., and Yonezawa T.: 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

2. 学会発表

1. 藤田純弘, 西根 玄, 谷 宏, 本多丘人, 森田 学. 若者の歯科に関する用語の認識と理解. 日本口腔衛生学会北海道地方会総会・学術大会. 札幌 2007年2月17日.
2. 角館直樹, 須貝 誠, 藤澤雅子, 森田 学. 処置別に見た歯科医業収支の比較～定期健診及び歯冠修復についての検討～. 日本口腔衛生学会北海道地方会総会・学術大会. 札幌 2007年2月17日.
3. 山口友隆, 江崎光恵, 臼井真吾, 柏崎晴彦, 兼平 孝, 森田学, 井上農夫. 精神科病院における口腔ケア介入研究. 日本口腔衛生学会北海道地方会総会・学術大会. 札幌 2007年2月17日.
4. 中村公也, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 森田 学. 骨芽細胞様MC3T3-E1細胞におけるRIG-Iの発現. 歯科基礎医学会学術大会. 札幌 2007年8月31日.
5. 角館直樹, 森田 学, 藤澤雅子, 永山正人, 川浪雅光. 歯周病患者のセルフケアに対する自己効力感測定尺「SESS」の開発—信頼性と妥当性の検討—. 日本歯周病学会. 東京. 2007年9月22日.
6. 相田 潤, 森田 学, 安藤雄一, アクターラヘナ, 小坂 健. 3歳児う蝕有病者率の社会経済的狀態に関連する地域格差は拡大傾向にある. 日本口腔衛生学会. 東京. 2007年10月4日.
7. 栗田啓子, 後藤豪香, 堀川右気, 本郷博久, 高橋一郎, 森田 学. 保健センター歯科非受診または受診中断者について. 日本口腔衛生学会. 東京. 2007年10月4日.
8. 兼平 孝, 竹原順次, 本多丘人, 森田 学. 口臭と唾液中の溶存酸素 (DO)および化学的酸素要求度 (COD)との関係. 日本口腔衛生学会. 東京. 2007年10月4日.
9. 藤澤雅子, 森田 学, 角館直樹. 歯科衛生士における道徳的感性尺度の開発—信頼性と妥当性の検討—. 日本口腔衛生学会. 東京. 2007年10月4日.

10. Rahena Akhter, Nur Muhammad Monsur Hassan, Jun Aida, Abdul Zubair, Tatsuo Yamamoto, Manabu Morita. Relation between betel quid additives and established periodontal disease among Bangladeshi patients. 日本口腔衛生学会, 東京, 2007年10月5日.
11. 角館直樹, 須貝 誠, 藤澤雅子, 森田 学. 歯周治療の継続に自己効力感が及ぼす影響について. 日本口腔衛生学会. 東京. 2007年10月5日.
12. 本郷博久, 本多丘人, 江崎光恵, 森田 学. 事業所における歯科健康診査の有用性. 北海道医学大会 (産業衛生分科会). 札幌 2007年10月13日.
13. Mitsue Esaki, Shigeaki Abe, Ikuhiro Kida, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, Fumio Watari: Determination of administered magnetite nanoparticles in mice: Magnetic resonance imaging and X-ray scanning electronic microscope. : International Dental Materials Congress 2007 Bangkok, 2007年11月24日.
14. 阿部薫明, 小山千佳, 江崎光恵, Iosif Danel Rosca, 赤坂司, 宇尾基弘, 森田学, 久保木芳徳, 亘理文夫: マウス体内での有機・無機粒子の体内循環挙動の追跡: 第20回代用臓器・再生医学研究会 札幌, 2008年2月2日
15. 江崎光恵, 森田学, 阿部薫明, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理文夫. 歯科診療時に生じる切削粉の観察とMRIによる体内動態可視化法の検討. 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. 平成19年度第4回研究班会議. 苫小牧 2008年2月25日.

G. 知的所有権の取得状況

無し



図 1-1

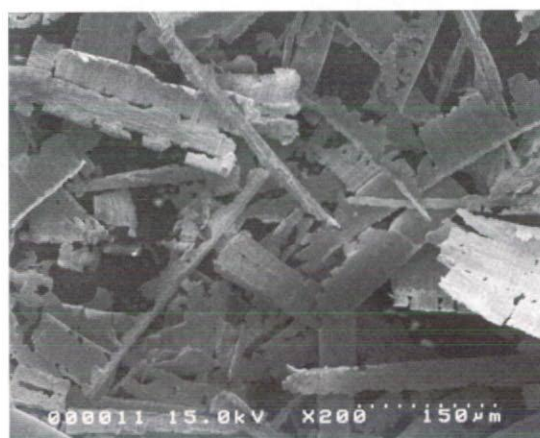


図 1-3

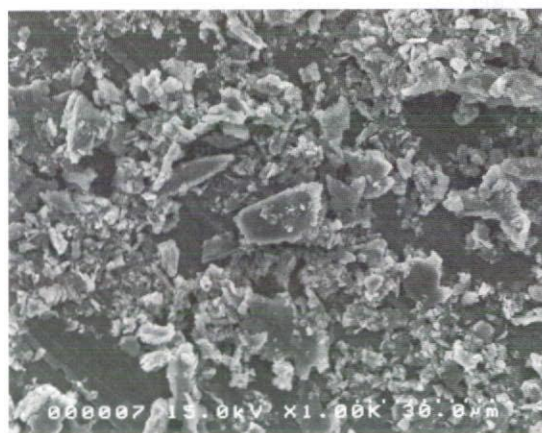


図 1-2

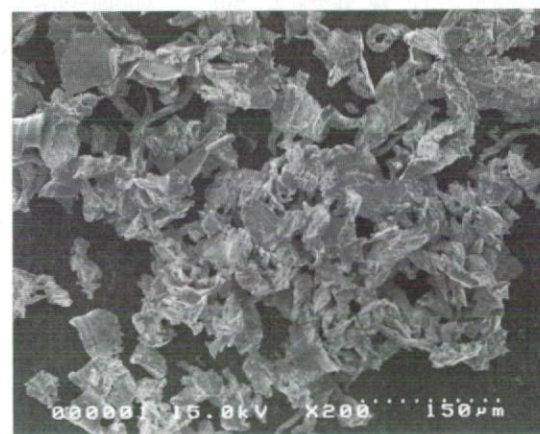


図 1-4

図 1 切削粉の SEM 像

(1-1 : 歯/DP 200倍 1-2 : 歯/DP 1000倍 1-3 : 金パラ/DP 200倍 1-4 : 金パラ/WC 200倍)

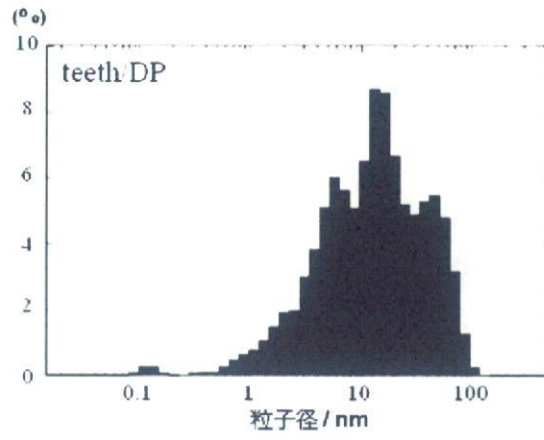


図 2-1

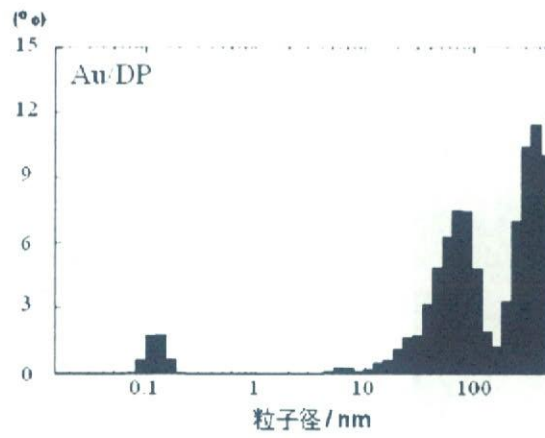


図 2-2

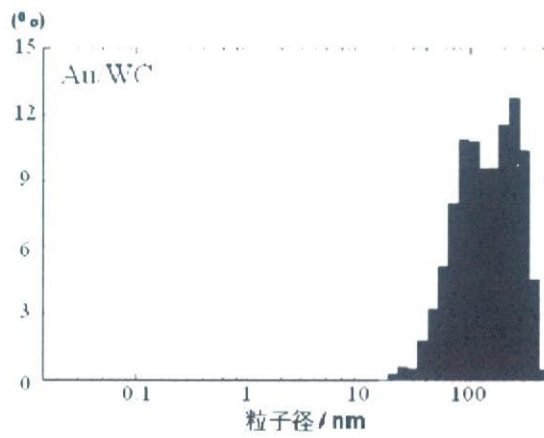


図 2-3

図 2 切削粉の粒度分布計測結果
(2-1 : 歯/DP 2-2 : 金バラ/DP 2-3 : 金バラ/WC)

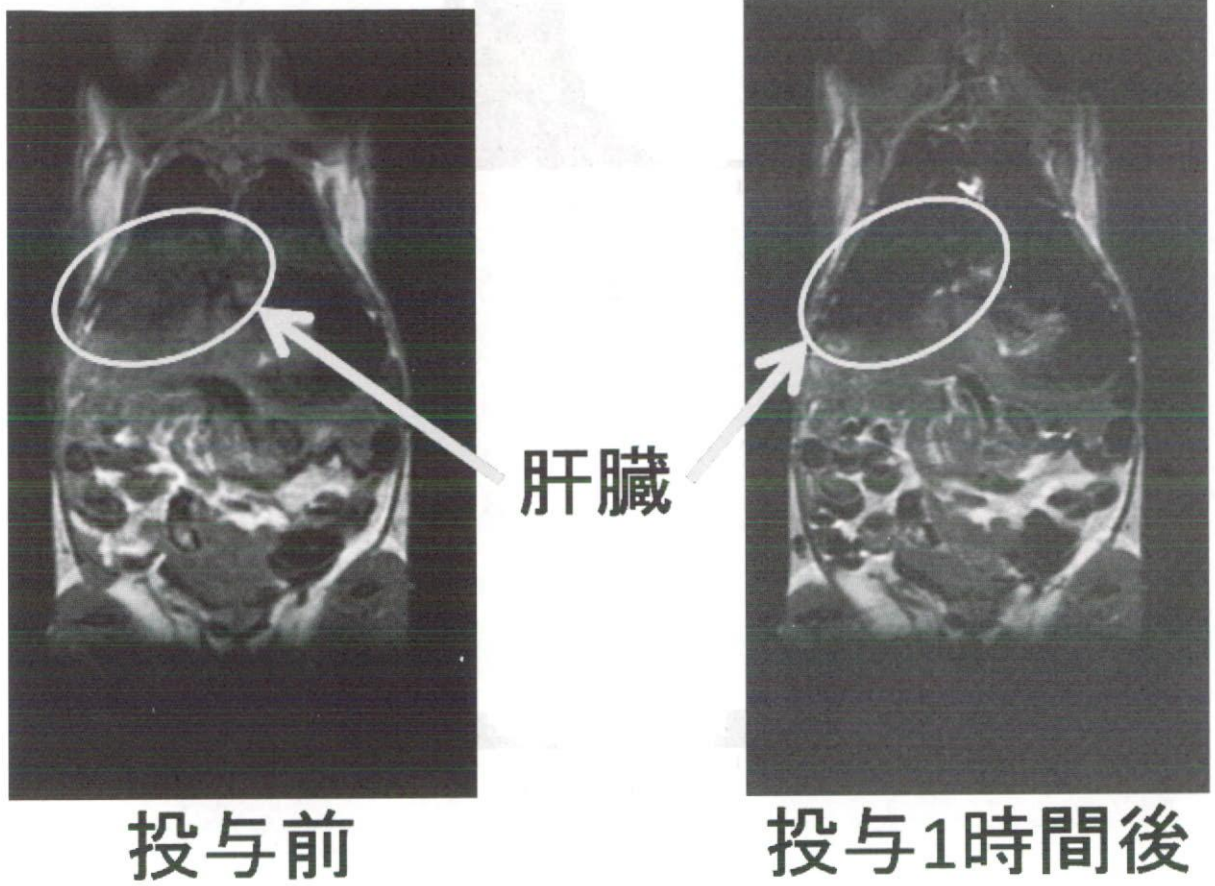


図3 マグネタイト投与によるマウス肝臓のMRIの変化

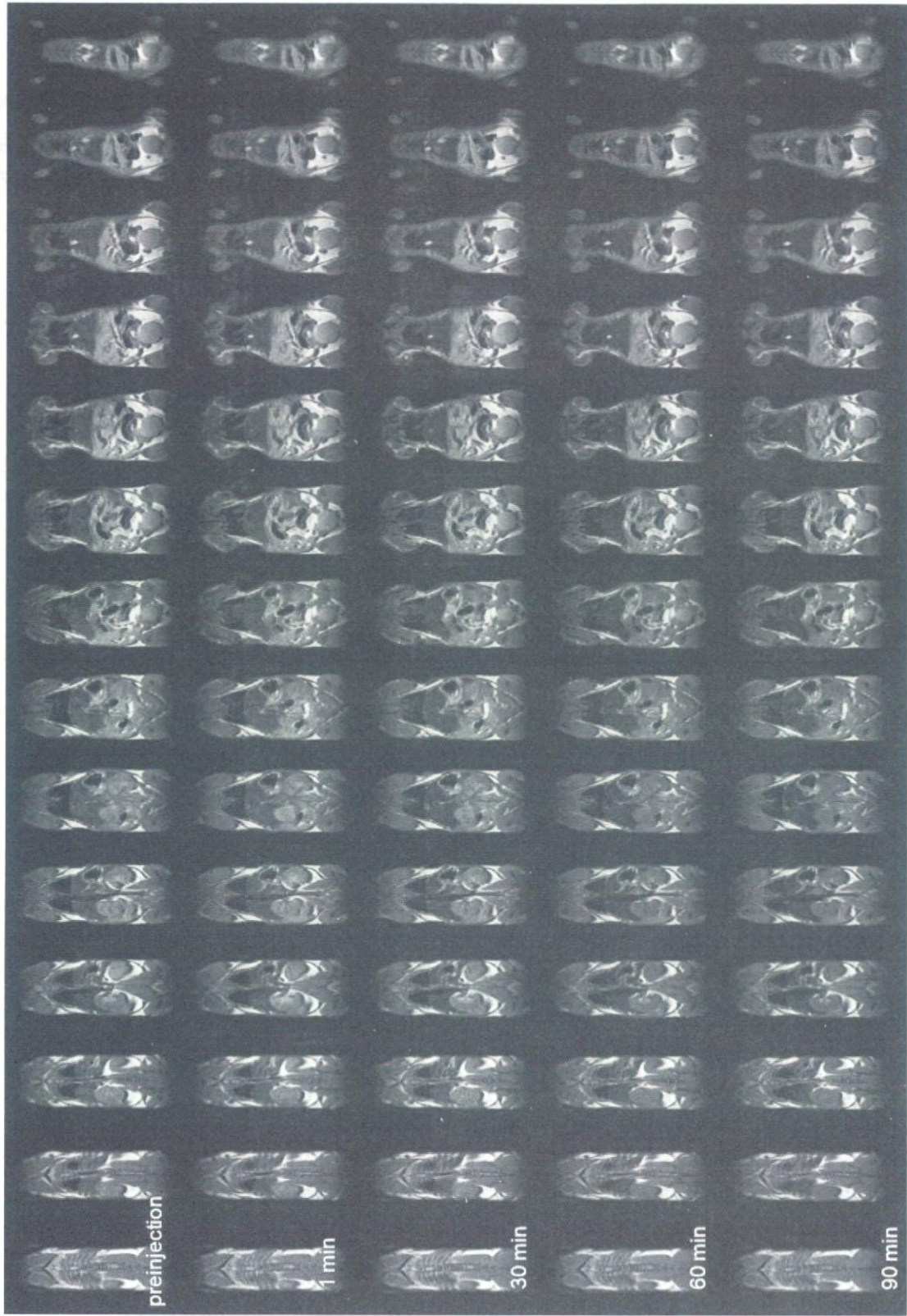


図4 マグネタイト投与後のマウスMRIの経時変化

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

カーボンナノチューブの植物に対する反応性の評価に関する研究

分担研究者	古月文志	北海道大学大学院地球環境科学研究院教授
研究協力者	藤井明洋	北海道大学大学院地球環境科学研究院院生
研究協力者	林 春	北海道大学大学院地球環境科学研究院院生
研究協力者	譚 暁明	北海道大学大学院地球環境科学研究院院生

研究要旨

本研究は、ナノ材料の植物培養細胞に対する毒性の評価、すなわち、ナノ材料の「ファイト・トキシコロジー」に関するものである。イネ培養細胞である OS-1 細胞 (*Oryza sativa* L.)、タバコ培養細胞である BY-2 (*Nicotina tabacum* L. cv. *Bright Yellow 2*) およびシロイヌナズナ培養細胞である T8 細胞を対象細胞として用い、カーボンナノチューブを含めた数種類のナノ素材のファイト・トキシコロジーについて検討した。ナノ素材を培地又は培養液に添加した後、細胞の培養実験を行なった。その結果、所謂「ナノ材料の毒性」は、ナノ材料の化学成分、物理状態および「有効添加量」等のパラメーターと深く関連することが判った。

A. 研究目的

ナノ素材、とりわけ日本発のナノ素材であるカーボンナノチューブの産業応用開発が進められている。カーボンナノチューブは、これまで、燃料電池や電子エミッターのような電子分野で主に使用されていたが、最近は、「カーボンナノチューブ加工衣料用繊維(日本経済新聞、2007年10月7日第1面)」といった衣料にも利用されるようになり、ナノ素材が身近な消費財として広く広がってきた。カーボンナノチューブ等のナノ素材が工業用品・日常用品に広く使われることに伴い、その環境への流出も強く懸念されている。排水や排気中に含まれるナノ素材は、植物と接する機会は、言うまでもなく、動物と接する機会よりも多い。しかし、「植物が介入したナノ素材の生態系への拡散・侵入」といったルートに関する研究は殆ど行なわれていない。そこで、今回は植物培養細胞を用い、ナノ素材の安全性について評価実験を行った。植物培養細胞としては、理研バイオリソースセンターが保存提供を続けているシロイヌナズナ(T87、2000年に植物として始めて全ゲノム塩基配列が解読され、モデル植物として広く使われている)を用いた。また、対照実験としては、イネ培養

細胞である OS-1 細胞 (*Oryza sativa* L.) およびタバコ培養細胞である BY-2 (*Nicotina tabacum* L. cv. *Bright Yellow 2*)も用いた。

B. 研究方法

炭素系のナノ素材としては、多層タイプのカーボンナノチューブ(MWCNTs)を選んだ。また、対照のナノ素材としては、カーボンブラックおよびアスベストを用いた。Table 1 は今回の実験に用いたMWCNTsの物性および処理方法を示す。

C. 研究結果

光学顕微鏡によるT87/CNTs相互作用に関する検討

未処理のカーボンナノチューブ(P-MWCNTs)、超音波処理したカーボンナノチューブ(U-MWCNTs)および界面活性剤を用いた分散処理したカーボンナノチューブ(D-MWCNTs)をそれぞれ培養液に添加し、シロイヌナズナ細胞T87に対する暴露実験(懸濁培養)を行った。カーボンナノチューブの細胞表面への付着に起因すると思われる暗所が数多く観察された(右の図1)。しかし、アスベスト(ASB)暴露実験(図1、右図)で観察された細

胞壁の破損に伴うミトコンドリアや葉緑体の流出、いわゆる、細胞壁/膜の損傷に起因する典型的細胞死のような状況には至らなかった。

重量測定法による細胞増殖に対するCNT影響の評価

シロイヌナズナ細胞T87の増殖量(ドライウェイト)を測定した。その結果、カーボンナノチューブの培養液への添加(添加量、10 mg/L)に起因すると思われる増殖量の減少が見られた。図2は、移植後7日目の細胞増殖量を示す。コントロールサンプル(通常の条件下での培養、Ctrl)の増殖率を100% とすると、P-MWCNTs、U-MWCNTs およびD-MWCNTsを添加した場合、その増殖率は、それぞれ、80.3%、74.2%、83.3%であった。T87増殖率の減少は、カーボンブラックを添加した場合(増殖率、66.7%)と比べ顕著な差が見られなかった。ここで、特筆すべきことは、カーボンナノチューブはアスベスト(増殖率、50%)と比べ、そのT87細胞の増殖に対する抑制力が遥かに弱いものであった。

TTC法による細胞生存率の測定 TTC法を用い、シロイヌナズナ細胞T87の生存率を測定した。その結果は図3に示す。カーボンナノチューブの添加によるT87の生存率の減少が見られた。しかし、その減少量は、アスベストと比べ遥かに少ない(カーボンブラックよりも少ない)。また、分散剤として用いた両性イオン界面活性剤はシロイヌナズナ細胞T87の成長周期に対して影響するものの、その生存率に対する影響が見られなかった。

濃度依存性に関する評価 カーボンナノチューブおよび対照ナノ素材(カーボンブラックおよびアスベスト)の添加量を変化させ(添加量、5 mg/L; 10 mg/L; 50 mg/L)、ナノ素材の添加量の影響について調べた。シロイヌナズナ細胞T87の生存率はナノ素材の添加量の増加と共に、ほぼ直線的に減少することがわかった。

D. 考察および結論

カーボンナノチューブはシロイヌナズナ細胞T87に対して、いわゆる「ネガティブな効果」があったことは、形態観察、重量測定および生存率測定の実験結果から結論することができる。しかし、いわゆる「カーボンナノチューブ毒性」は、その程度はアスベストと比べ極めて低いこと、ある意味ではカーボンブラックよりも低いことを言える実験データが得られた。また、カーボンナノチューブのような炭素ナノ素材がその製造技術の進化により、これまでに知られていた生体反応で支配的な触媒効果又はイオン溶出に基づく化学的效果とは異なり、サイズ・形状に依存した物理的な効果に基づく生体効果が発現することになるであろう。カーボンナノチューブのサイズ・形状効果を生かした植物分野におけるCNT応用に関する研究は本研究室で行なわれている。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Xiao-Ming Tan, Bunshi Fugetsu, Multi-walled carbon nanotubes interact with cultured rice cell: evidence of a self-defense response, Journal of Biomedical nanotechnology; 3, 285 (2007).

2. 学会発表

1. Akihiro Fujii, Bunshi Fugetsu, International Symposium on Metallomics 2007, Nagoya, November 28-December 1, 2007

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案取得

なし