

15:50~16:00

「Imogolite上での細胞培養」

北海道大学大学院歯学研究科

○石川紘佑・赤坂司・八若保孝・亘理文夫

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

16:10~16:20

「ナノハイドロキシアタパイトーコラーゲン複合体膜とBMPによる硬組織誘導」

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

○天雲太一、菅谷 勉、宮治裕史、田中陽、福田寛恵、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生体理工学教室

宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫

16:30~16:40

「収束型電界X線源の現状と将来の展望」

名古屋工業大学大学院工学研究科

○奥山 文雄

16:50~17:00

チタン磨耗粉によって惹起されるオステオライシス発生機序における

MIF（マクロファージ遊走阻止因子）の機能解析

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

17:10~17:20

「人工股関節から発生した磨耗粉の形態解析」

(財) ファインセラミックスセンター

○橋本 雅美、水野 峰男、北岡 諭

17:30~17:50 休憩

17:50~18:00

「生体に投与した各種マイクロ・ナノ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、亘理 文夫

北海道大学名誉教授、(株)高研バイオサイエンス

久保木芳徳

18:10~18:20

「Effects of multi-wall carbon nanotubes on rice cells in *in vitro* culture system」

○譚 晓明¹⁾、古月 文志¹⁾、亘理 文夫²⁾

1) 北海道大学大学院環境科学院

2) 北海道大学大学院歯学研究科

18:30~18:40

「ナノ物質の生体内挙動について-皮下および骨膜下での反応とフラレーンの体内移行-」

○平田恵理¹⁾, 野田坂佳伸¹⁾, 佐藤義倫²⁾, 菰澤 崇³⁾, 赤坂 司²⁾
宇尾 基弘²⁾, 大堀 ことは²⁾, 亘理 文夫²⁾, 田路 和幸¹⁾, 横山 敦郎²⁾

- 1) 北海道大学大学院歯学研究科
- 2) 東北大学大学院環境科学研究科
- 3) プルカー・ダルトニクス (株)

18:50~19:00

「生物試料に対する投影型X線顕微法に関する2, 3の話題」

株式会社 東研 X線開発部

○矢田 慶治

19:10~19:20

「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」

北海道大学大学院歯学研究科

寺田 典子、○宇尾 基弘、北川 善政、亘理 文夫

19:30 終了

11月13日 (火)

9:00~9:10

「歯科材料・口腔内組織の高分解能電子顕微鏡観察と雰囲気制御TEM観察」

北海道大学大学院歯学研究科

○宇尾 基弘、亘理 文夫

北海道大学大学院工学研究科

橋本 直幸、奥寺 公也、浜田 弘一、大貫 惣明

9:20~9:30

「In vivo evaluation of collagen-based scaffold reinforced by chitin fibres for bone tissue engineering.」

Xiaoming Li^{1,2}, Qingling Feng², Fuzhai Cui² and Fumio Watari¹

¹ Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Japan;

² Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, China

9:40~9:50

「ゾウリムシにおける銀粒子の細胞毒性試験」

石巻専修大学大学院理工学研究科

○阿部 大基、芳賀 信幸

10:00~10:10

「BMP2修飾炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨再生能」

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

10:20~10:40 休憩

10:40~10:50

「EXPEEMによる表面観察-Ni₂Pの2ドメインの識別の可能性」

北海道大学触媒化学研究センター

○朝倉 清高・宮本 剛志

11:00~11:10

「カーボンナノチューブコートしたシリコン・ラバーでの細胞接着」

北海道大学大学院歯学研究科

○松岡真琴・赤坂司・戸塚靖則・亘理文夫

株式会社名城ナノカーボン

橋本剛

11:20~11:30

「白金ナノフラワーを用いた生体関連物質のLDI-MS測定」

東京大学大学院理学系研究科

○米澤 徹

関西大学化学生命工学部

川崎 英也、荒川 隆一

11:40~11:50

「シロイヌナズナ T87 培養細胞に対するCNTsの影響」

○林 春¹⁾、古月 文志¹⁾、亘理 文夫³⁾

1) 北海道大学大学院環境科学院

2) 北海道大学大学院歯学研究科

12:00~12:20

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

単層カーボンナノチューブ膜での骨芽細胞様細胞の培養

北海道大学大学院歯学研究科

赤坂 司、横山 敦郎、松岡 真琴、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

株式会社 名城ナノカーボン

橋本 剛

1. 目的

近年、最も注目されている材料の1つにカーボンナノチューブ (CNT) が挙げられ、エレクトロニクス分野やエネルギー分野を中心に集中的な研究が進行中である。一方で、CNTのバイオ分野への応用研究も開始されており、AFMの探針、タンパク質の結晶化、バイオセンサーへの応用が注目を集めている。

我々の研究グループでは、世界に先駆けカーボンナノチューブ膜を細胞培養のスキヤホールドとして使用し、骨芽細胞様細胞 (Saos2) の培養を検討したところ、①良好な細胞増殖、②強い細胞接着、③細胞の進展、④トリプシンによる細胞剥離の耐性、⑤細胞の仮足とカーボンナノチューブの絡み合い、⑥アルカリフォスファターゼ活性の向上など興味ある特性を解明してきた。以上の細胞培養におけるカーボンナノチューブの特性は、本来の利点や特性の一部であると推測され、さらなる詳細な検討が望まれる。

本研究では、CNTのバイオ分野におけるさらなる応用展開を目指し、CNTシートおよびコート細胞培養用基材での培養を検討し、①多層カーボンナノチューブおよび単層カーボンナノチューブでの詳細な基礎的比較検討、②市販細胞培養用基材との比較によるカーボンナノチューブ培養基材の位置づけ、③カーボンナノチューブの新たな機能の発見を焦点に置き、検討を行った。

2. 実験方法 (一部抜粋)

単層カーボンナノチューブ (名城ナノカーボン製) および多層カーボンナノチューブ (NanoLab製) を脱イオン水に200 μ g/100mLとなるように加え、超音波処理を行い、47mmのポリカーボネート製膜上に吸引濾過を行うことにより製膜した。その後、乾燥、UV滅菌し培養に使用した。

細胞培養は、ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞であるSaos2を用い、DMEMに10%FBSおよび1%PSNを添加した培地にて、37 $^{\circ}$ Cで5%CO₂環境下にて所定時間行った。細胞の観察は、2.5%グルタルアルデヒドによる固定後、一般的な乾燥条件にて行い、走査型電子顕微鏡にて行った。

3. 結果と考察（一部抜粋）

単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブおよび細胞培養用ポリスチレンディッシュを用いた細胞接着試験の結果 (Fig 1)、いずれの基材において良好な細胞接着が観察された。カーボンナノチューブでは初期に接着許容反応の様な作用が観察されたが、3時間後では多層>ポリスチレン>単層の順であった。特に多層カーボンナノチューブでは初期の接着が強く、カーボンナノチューブの吸着特性に加え、細胞の仮足とCNTの凹凸との物理的な絡み合いが影響しているものと考えられた。

接着した細胞の伸展を観察した結果 (Fig 2)、カーボンナノチューブ基材よりもポリスチレンの方が伸展が早いことが観察された。単層と多層を比較すると、若干であるが多層の方が伸展した。

以上の接着試験の結果（一部抜粋）より、詳細な基礎検討を行うと各培養基材の違い（特性）が明白となった。さらに他の特性を検討することにより、用途に応じた使い分けが可能となると考えられる。

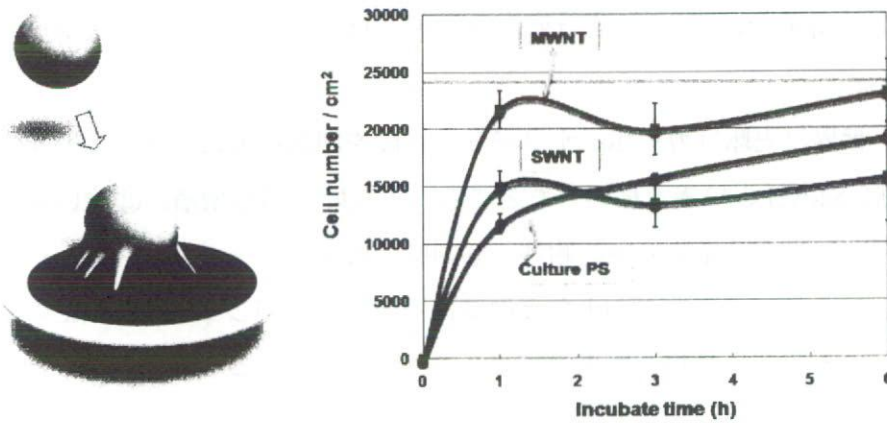


Fig 1. Adhesion of SaOS-2 onto CNT sheets

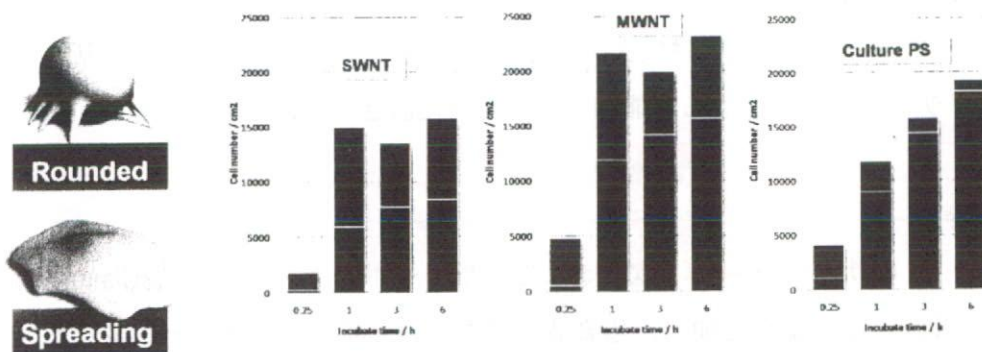


Fig 2. Spreading of SaOS-2 on CNT sheets

Ref:

- 1) N. Aoki *et al.*, *Dent. Mater. J.*, 26, 178 (2007).
- 2) N. Aoki *et al.*, *J. Biomed. Nanotech.*, 1, 402 (2005).
- 3) N. Aoki *et al.*, *Chem. Lett.*, 35, 508 (2006).

イメージング質量分析を用いた生体組織評価 (3)

－水溶性 C₆₀ の精製－

東北大学大学院環境科学研究科

○佐藤 義倫・久保 拓也・田路 和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

葦澤 崇

北海道大学大学院歯学研究科

赤坂 司・横山 敦郎

水溶化フラーレン (C₆₀-(OH)_n) の体内挙動を調べる際に、精製された C₆₀-(OH)_n が必要である。今回使用する C₆₀-(OH)_n は塩 (NaCl) が混入しているため、これまでに以下のような精製を行なった； C₆₀-(OH)_n 固形物を 10% のメタノール 2.0 mL に溶解させる。その後、平均細孔径 12.5 nm の直径 55~105 μm の C18 カラム充填材が充填されたオープンカラム (直径 30 mm) に 100% のメタノール、蒸留水をそれぞれ順番に流し、溶媒と充填材を馴染ませた後、10% メタノールに溶解した C₆₀-(OH)_n をカラムに投入し、塩の分離を行なった。しかし、塩濃度が高濃度であるため、C₆₀-(OH)_n と塩は凝集した状態で、塩を分離することができなかった。そこで本研究では、イオン交換樹脂で塩を取り除いた後、オープンカラムで精製することを目的とした。

C₆₀-(OH)_n 固形物 61.1 mg を 50 mL の蒸留水に溶解させる。さらに、H 置換型イオン交換樹脂 (AMBERLITE IR120B H AG, オルガノ株式会社) を 6.0 g 投入し、一晚攪拌させ Na を H に置換後、ろ過した。次に、得られたろ液に OH 置換型イオン交換樹脂 (AMBERLITE IRA410 OH AG, オルガノ株式会社) を 6.0 g 投入し、一晚攪拌させ Cl を OH に置換させた。置換後の溶液はロータリーエバポレーターで乾燥させ、10% メタノール 2.0 mL で溶解させた。その後、10% メタノールに溶解した C₆₀-(OH)_n を均細孔径 12.5 nm の直径 55-105 μm の C18 カラム充填材が充填されたオープンカラム (直径 30 mm) に投入し、塩の分離を行なった。分離した溶液は、TOF-MS により C₆₀-(OH)_n の精製を評価した。

イオン交換樹脂で処理したサンプルは、TOF-MS スペクトルの低質量側に検出される塩の質量が検出されていないことから、塩が除去されていることを確認した。しかし、1000 m/z 付近に不純物と考えられる質量数が検出された。これはイオン交換樹脂から由来するものと考えられる。イオン交換樹脂処理、かつオープンカラム処理して得られた水溶化 C₆₀-(OH)_n の TOF-MS スペクトルには、不純物ピークが検出されていないことから、オープンカラムによって不純物が除去され、C₆₀-(OH)_n が精製されていることがわかった。

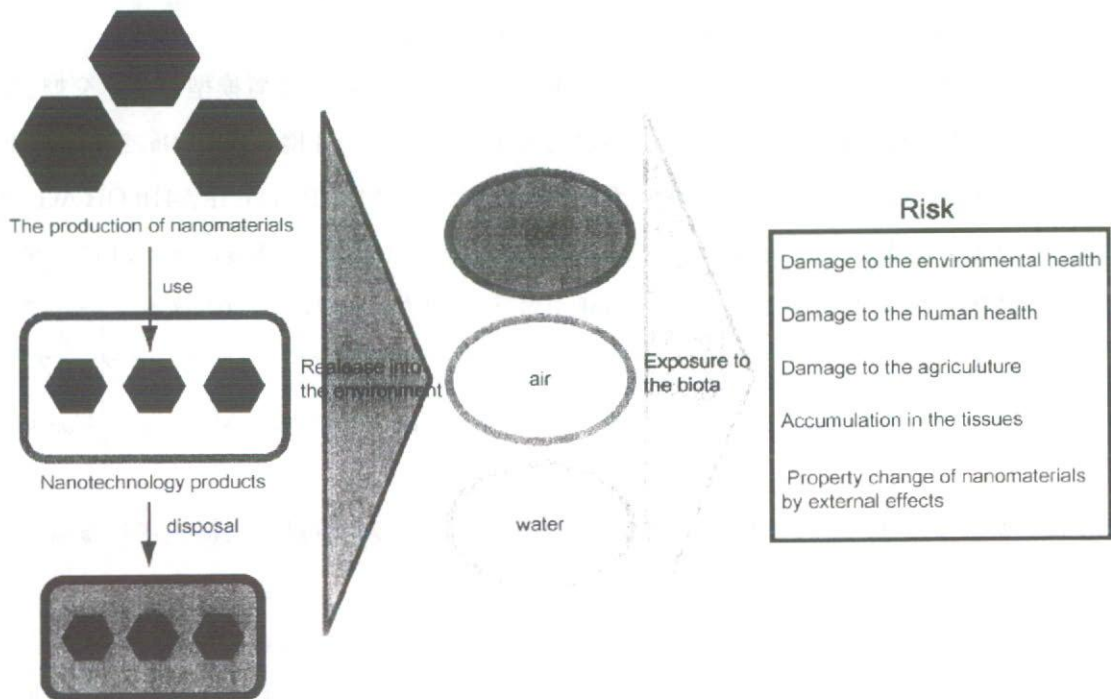
植物細胞におけるカーボンナノチューブの毒性評価

北海道大学大学院環境科学院

○藤井明洋・古月文志・亘理文夫

1. 背景

近年、ナノテクノロジーの発展は目覚ましく、我々の身近な物にもナノマテリアルが導入されるようになった。ナノマテリアルが環境や生命に暴露される可能性は高まりつつある。しかし、その危険性に対する解明はいまだに不十分である。本研究では、これまでにあまり重要視されていなかった植物に対するナノマテリアルの毒性の評価に着目している。植物は生態系において大きな役割を担っており、我々の食料としても欠かせない。このため、ナノマテリアルが植物に影響がある場合そのインパクトは絶大で、植物細胞に対するナノマテリアルの生体影響評価は動物細胞と同様に急務である。本実験では、現在有望視され今後さらに多量の生産が見込まれその環境への影響が大きく懸念されるカーボンナノチューブと、世界の食料を支えモデル植物としても研究が盛んなイネという、ナノとバイオの代表格二つを用いてナノマテリアルの植物に対する影響評価を行った。



2. 実験方法

2.1 Material

MWCNT は直径 10-30nm、長さ 5-15 μ m を有し、実験には zwitterionic surfactant を含む分散剤で分散させたものを用いた。イネ細胞は *oryza sativa* L. 種由来のカルス細胞を用い、培地は MS

(Murashige and Skoog) 培地を用いた。MWCNT をMS 培地に均一に分散させた後、イネ細胞の懸濁培養を行ない、細胞細胞に対するMWCNTの影響を評価した。なお、分散剤の影響を考慮するため MS 培地に分散剤のみを添加した実験も行なった。

2.2 SEM による形態観察

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用い、細胞形態観察を行った。サンプルの前処理としては、まず、細胞を 4% グルタルアルデヒドで固定し、その後、エタノール脱水、t-ブチルアルコール置換および凍結乾燥処理を行った。

2.3 TTC reduction assay

100 mgの培養細胞を取り出し、TTC (2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride) を含む培地で18時間培養した。細胞内で還元されて生成した formazan をエタノールで抽出し、吸光度計を用いて波長 485 nm で formazan の濃度を測定した。コントロールサンプル (通常条件での培養) の値を 100 として、それぞれの培養条件下における細胞の生存能力を算出した。

2.4 Necrosis assay

一定量に取り出した細胞をプロトプラスト単離酵素溶液 (3% cellulase, 0.3% pectolyase Y-23, 0.4M mannitol) を用いプロトプラスト化した後、PI (propidium iodide, 10 μ g/ml) で染色した。各サンプルにおいて、 3×10^4 個の細胞の蛍光シグナルをフローサイトメーターで解析することにより、ネクローシスを生じた細胞の割合を算出、評価した。

2.5 Regrowth assay

培養した細胞を 20 mg 取り出し、MS 固体培地上で、12 日間培養し、その重量 (flesh weight) を測定し成長度を算出した。

3. 結果と考察

3.1 SEM による形態観察

SEM 観察の結果、MWCNT がイネのカルス細胞の表面にその繊維状の構造を利用して絡まるように付着することが判った。また、MWCNT はカルス細胞の全面に付着するのではなく部分的に散在しており、特にカルス細胞の隙間に入り込み、密集・沈着する様子が観察された。

3.2 TTC reduction assay

MWCNT に暴露した細胞の生存能力を測定するため TTC reduction assay を行った。細胞内にできた formazan 量を吸光度計で測定したところ、分散 MWCNT に暴露されたサンプルにおける formazan 量の減少が認められなかった。このことは、分散 MWCNT は細胞のミトコンドリアの活動に大きな生理的ストレスを与えることなく、細胞の生存能力は通常通りに維持されていることが示唆された。

3.3 Necrosis assay

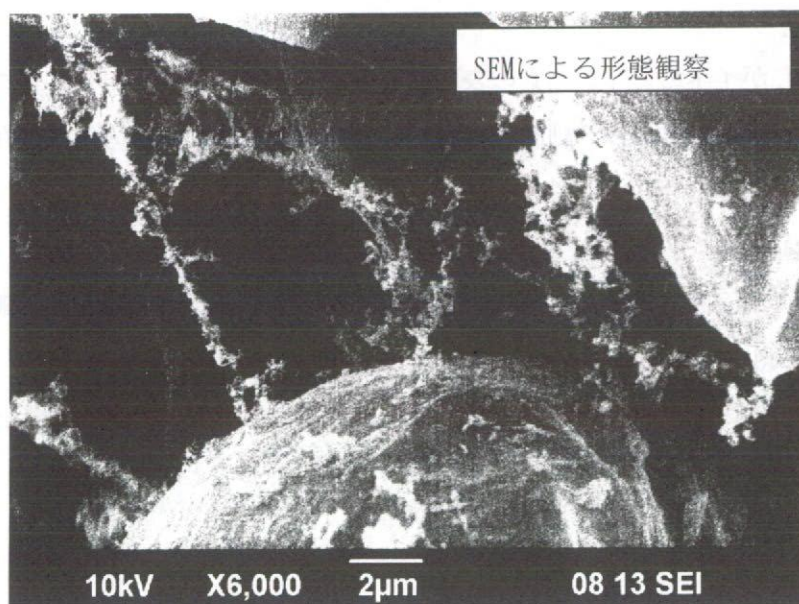
カーボンナノチューブはその繊維状の構造からアスベストのような傷害作用が懸念されている。そこで、MWCNT の細胞膜への傷害作用を調べるためフローサイトメーターと PI を用いた実験を行った。PI のシグナルを解析したところ、MWCNT の膜傷害による PI の細胞内への透過は確認できなかった。MWCNT の構造はイネ細胞に対して大きな物理的細胞傷害をもたらす危険性が小さいことが示唆された。また、イネのカルス細胞が細胞壁を持ち、さらに細胞が凝集した状態にあるという性質から、カーボンナノチューブの物理的作用が限定的になったことも考えられる。

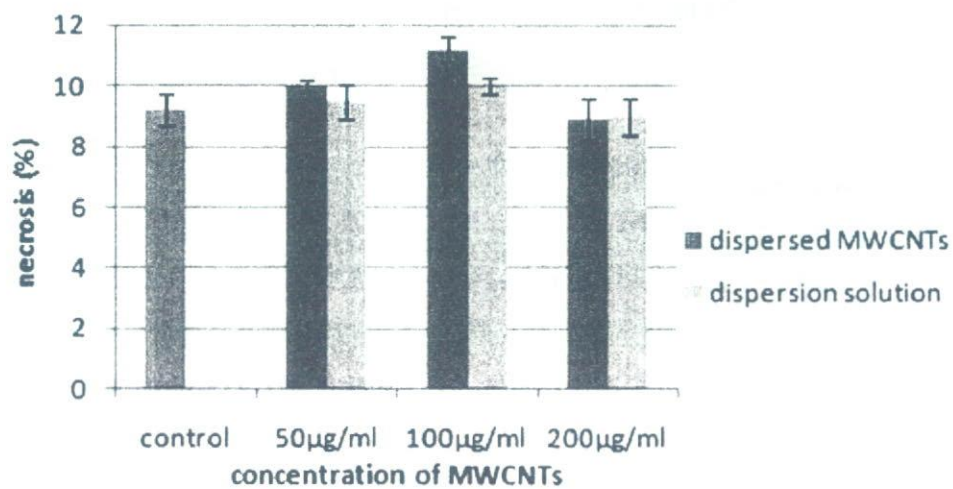
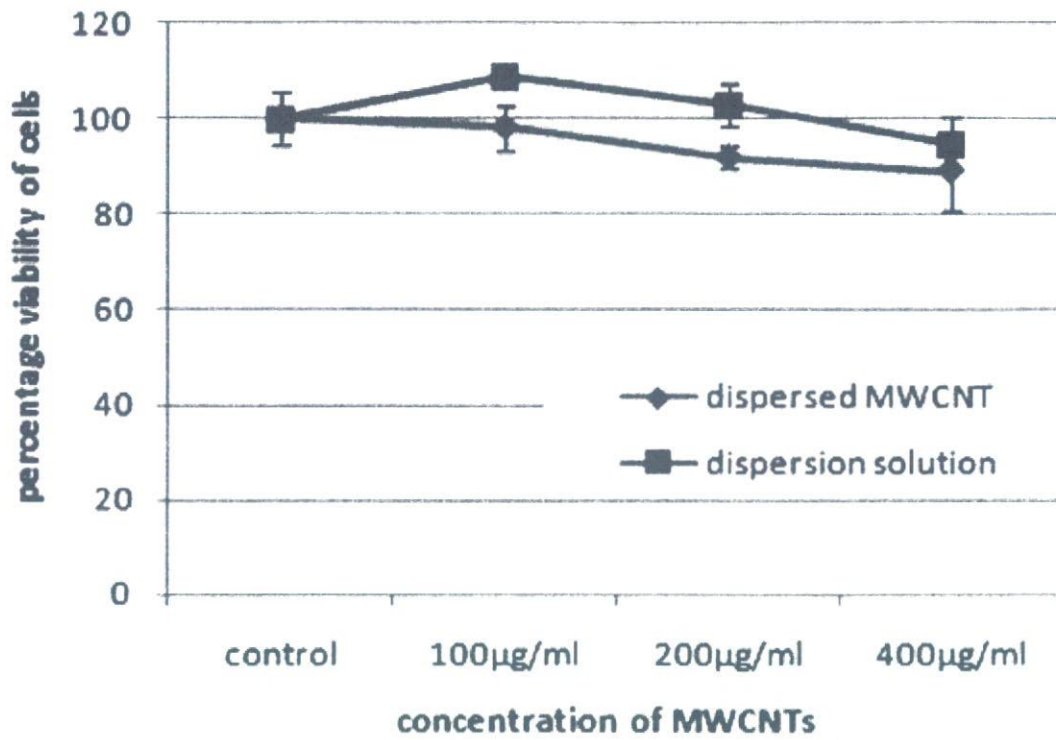
3.4 Re-growth assay

MWCNT が細胞表面に付着する。それが細胞の増殖に大きな変化を与えないかを確認するため、細胞量をパラメーターにして実験を行った。MWCNT に暴露した懸濁細胞を、MS 固体培地上で細胞が定常期に至る 12 日間培養した。最初と最後の flesh weight を測定したところ、コントロールと比べ MWCNT を暴露した細胞の成長度に大きな差異は見られなかった。

4. 結論

植物細胞は、積極的に外環境の物質を取り込む食作用や飲作用を有しておらず、MWCNT が能動的に細胞内に取り込まれる可能性は少ない。また、受動的に暴露される MWCNT は直径がナノメートルサイズで長さがマイクロメートルサイズであり、植物細胞の細胞壁を透過して細胞膜へアプローチすることは考えにくい。このため、MWCNT の植物細胞に対する影響は限定されていくことが考えられる。一方、動物細胞への MWCNT の悪影響はいくつか報告されているがその明確なメカニズムは解明に至っていない。動物細胞と細胞構造も細胞分裂機構も異なる植物細胞に焦点を当てることで、細胞とカーボンナノチューブの相互作用に新たな視点を加えその解明の一助になることを望む。今後、他の植物細胞、他のナノマテリアルや単層カーボンナノチューブ等を用いて実験を行い、今回の結果も含めて比較検討していきたい。まだ不確実性の残る生体・環境への危険性に対して「未然の防止」が必要であり、ナノトキシコロジー研究のさらなる発展を期待したい。





Growth values (ratio between final and initial fresh weights)

	Control	50 μg/ml	100 μg/ml	200 μg/ml	400 μg/ml
Control	2.24 ± 0.15				
Dispersed MWCNTs	2.06 ± 0.21	1.62 ± 0.25	1.84 ± 0.21	1.98 ± 0.13	
Dispersion solution	1.93 ± 0.08	2.08 ± 0.04	1.98 ± 0.06	1.61 ± 0.19	

カーボンナノチューブ複合材料の人工股関節ライナーへの応用

東北大学大学院工学研究科¹・東北大学金研²

○大森守¹・山本剛¹・橋田俊之¹・木村久道²・大久保昭²

1. 目的

人工股関節の重要な部分はライナーとヘッドである。ライナーはヘッドの受けになる部品であり、現時点では超高密度ポリエチレンで作られている。高分子にすることでヘッドとの摩擦係数を小さくしている。しかし、一年間に0.3~0.5mmの速さで磨耗するのが大きな問題になっている。すなわちライナーの磨耗による薄くなってヘッドとの密着性が悪くなり、磨耗により消失すれば関節としての機能がなくなる。さらに磨耗粉は人工股関節を固定部分に侵入し骨を犯すため、固定が緩んで歩行が困難になる。ヘッドはコバルト・クロム合金が主であったが、最近ではジルコニアから作られたものの生産が伸びてきている。金属よりセラミックスの方が鏡面に加工しやすいためであり、鏡面にすることでカップの磨耗を小さくすることができる。

カーボンナノチューブは、発見されて以来工業材料への応用の試みが広く行われてきている。高分子やセラミックスとの複合材料にし、カーボンナノチューブの特性を発揮させた新材料の開発もその一つである。カーボンナノチューブアルミナ複合材料に関してはライナーへの適用が考えられる。アルミナは耐摩耗性に優れているため、ライナーへの応用も試みられてきた。しかし、ヘッドとの摩擦係数が大きいこと、靱性が小さいため破壊されやすいことなどのために、ライナーとして使われることはなかった。カーボンナノチューブとアルミナの複合材料は、摩擦係数が小さく靱性をアルミナより大きくできる可能性がある。しかし、工業製品になりうる複合材料は作られてこなかった。本研究では、従来のカーボンナノチューブアルミナ複合材料の合成とは異なる方法、すなわち原料にアルミナ粉を使用する代わりに、その前駆体である水酸化アルミニウムを使用する方法を試みている。この試みにより実用化できる性能の製品を作れそうなので、ライナーへの応用を考えた研究を行っている。

2. 実験方法

この研究においては、価格の高い単相カーボンナノチューブを用いたのでは製品の実用化が困難なので、現時点で価格の低い多層カーボンナノチューブ (MWNT、NanoLab社製) を用いた。アルミナの前駆体として水酸化アルミニウム ($\text{Al}(\text{OH})_3$ 、和光純薬製)、添加剤として水酸化マグネシウム ($\text{Mg}(\text{OH})_2$ 、和光純薬製) とシリカゲル ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬製) を使用した。これらの原料を蒸留水に分散し、界面活性剤を添加してスラリー状にして混合した。このスラリーを乾燥して得られた混合粉体を、アルゴンガス雰囲気において室温から600℃まで1時間で昇温し、その温度に15分間保持して水酸化アルミニウムを分解して水分を除去した。この分解原料を使い放電プラズマ焼結機 (SPS

シンテックス社製、SPS1050) により真空中で1600℃の温度で15分間焼結し、直径30mmの円盤状の複合材料を得た。

複合材料の破断面を走査型顕微鏡 (SEM、日立製作所製、FE-SEMS-4700) により観察した。複合材料を $2 \times 3 \times 25 \text{mm}^3$ に切断し研磨してから、スパン20mmで万能試験機 (インストロン製、5582) により3点曲げ強度を測定した。同じ大きさの試験片と万能試験機を用いてノッチドビーム法により破壊靱性値を得た。摩擦係数については、窒化ケイ素の球と複合材料の板とを用いてボールーオンプレート法にて、荷重 (P) 下で500回 (500m) の滑りを行い、250回以上で摩擦によって発生する力 (F) を測定し $\mu = F/P$ の式を用いて計算した。

3. 結果および考察

3.1. アルミナ粉から得られて複合材料

この研究においては、原料に水酸化アルミニウムを用いている。始めに比較のためにアルミナ粉を使った複合材料を同一条件で焼結した。図1に複合材料の破断面を示すが、多層カーボンナノチューブは塊でアルミナマトリックス中に分散しているが、マトリックスとの結合がないため抜け落ちて穴のみが観察される状態である。多層カーボンナノチューブは凝集して安定化するため、水に分散させても一本ずつに分離することはない。アルミナ粉は $0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の大きさであり、この凝集体中へ進入することはないと考えられる。その結果、スラリー中の多層カーボンナノチューブ凝集体はアルミナ粉と混合されることなく、そのままの形でアルミナマトリックスの中に分散し、凝集体とマトリックスとの間には結合も存在しない。図1のような分散では、カーボンナノチューブ凝集体は穴としての役割しか果たさず、複合材料の強度や靱性はアルミナのそれより大きくはなく、逆にアルミナより劣化した機械的性能になると結論できる。

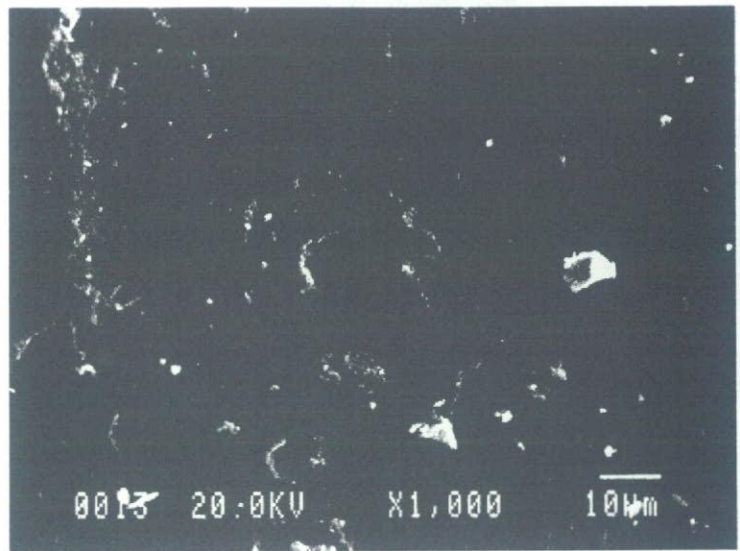


図1 Al_2O_3 -2wt% MWNT 複合材料の破断面のSEM写真

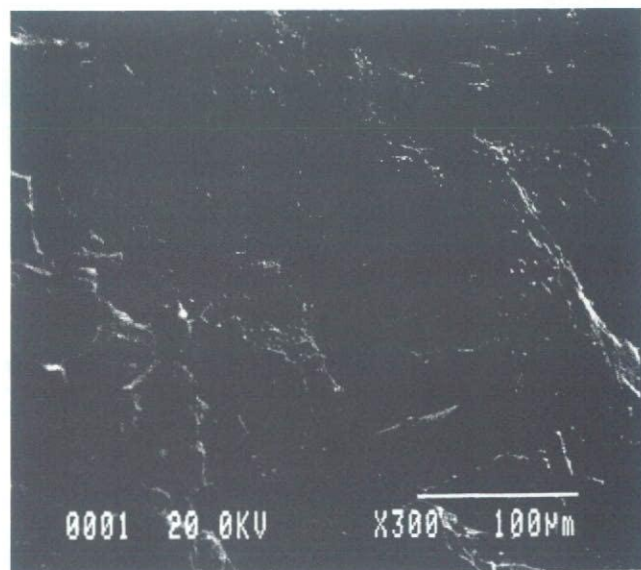


図2 $\text{Al}(\text{OH})_3$ -2wt% MWNT 複合材料の破断面のSEM写真

3.2. 水酸化アルミニウムのみとの複合材料

原料の水酸化アルミニウムと多層カーボンナノチューブとから合成した複合材料について、破断面の走査型電子顕微鏡写真を図2に示す。複合材料中のアルミナ結晶が大きく成長している。このような大きな結晶の生成は複合材料の強度を劣化させる。このようなアルミナ結晶の異常な成長を抑制するには添加剤を加える必要がある。添加剤としてはマグネシアとシリカの効果を検討したが、両者とも結晶成長を抑制できることが分かった。以後の複合材料では1wt%の添加剤を加えて合成している。

3.3. 結晶成長を抑制した複合材料

図3には複合材料の曲げ強度と破壊靭性値を多層カーボンナノチューブ(MWNT)添加量に対して調べた結果を示す。多層カーボンナノチューブを添加しないアルミナ焼結体は、市販のアルミナ粉から放電プラズマ焼結機によって作られている。強度は多層カーボンナノチューブを0.5wt%添加することで、アルミナのそれより大きくなっている。しかし、それ以上の添加量に対し強度は漸次減少している。2wt%の添加では400MPaの強度を維持して

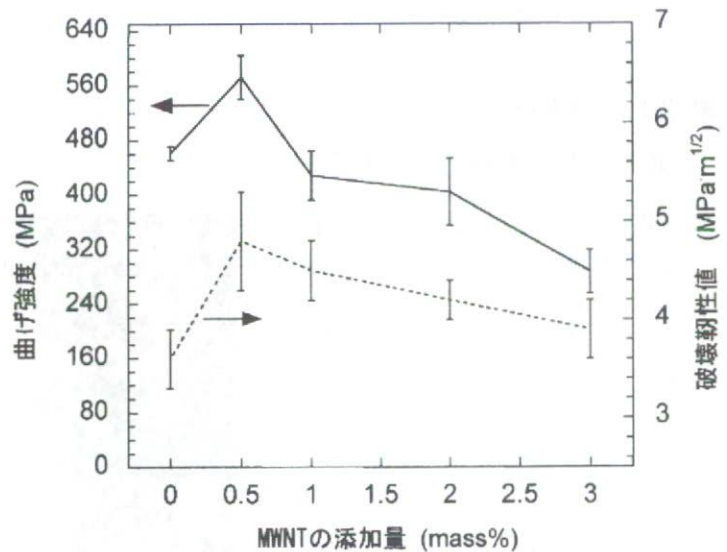


図3 MWNTの添加量と複合材料の強度と靭性の関係

おり、実用材料として使える範囲である。この複合材料に関し、多層カーボンナノチューブの大きい塊が3wt%以上の添加で観察されており、この大きい塊が強度の劣化に関与している。今後の課題として多層カーボンナノチューブの凝集体を小さくして分散するが重要であり、そうすることで多層カーボンナノチューブの添加量を多くしても、図3に示されるよりは強度の低下の少ない複合材料の合成ができると考えている。靭性については多層カーボンナノチューブを5wt%添加した複合材料でも、アルミナのそれより大きい。多層カーボンナノチューブを添加することで効果的にアルミナの靭性を大きく向上

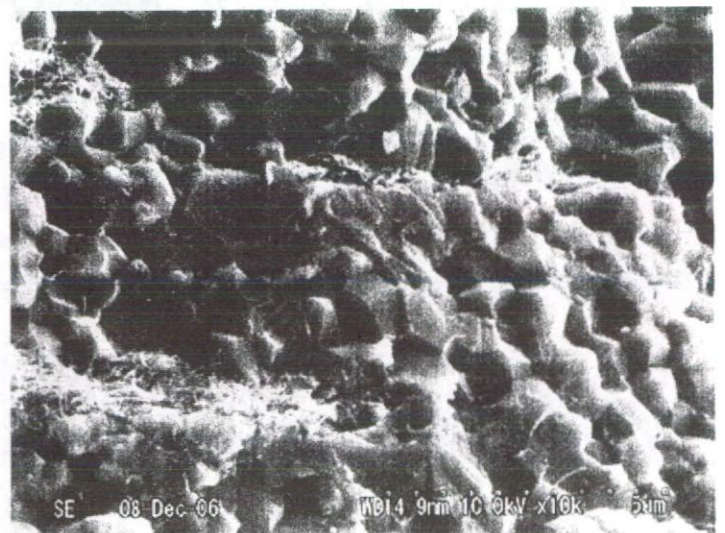


図4 Al(OH)₃-2wt%MWNT複合材料の破断面のSEM写真

ることができている。図4には複合材料の破断面のSEM像を示す。繊維状の多層カーボンナノチューブの引き抜き効果が観察され、この高靭化機構によりアルミナの靭性より大きくなっていることが分かる。

摩擦係数を測定した結果を図5に示す。多層カーボンナノチューブを2wt%添加することで、摩擦係数はアルミナの1/3以下に小さくなっている。この結果は摩擦係数に関しては、多層カーボンナノチューブを2wt%添加することで摩擦係数を小さくでき、それ以上の添加量は必要ないことを示している、

4. まとめ

多層カーボンナノチューブと水酸化アルミナから、製品として実用可能な複合材料を作れることが分かった。これまでに得られて結果を総合的に判断すると、複合材料を人工股関節のライナーへの応用は可能である。しかし複合材料の現時点での強度は大きいとは言えず、このままライナーに適用できると

は言えない。複合材料の合成の最大の難所は混合過程にある。これはカーボンナノチューブ—高分子複合材料でも同じであり、この混合課程が製品のコストを大幅に上昇させる結果となっている。本研究の複合材料の機械的性能はその組織に依存している。この組織はすべて混合課程で形成されるものであり、その改善に多くに時間がかかっている。これが解決できれば図4に示される強度および靱性より大きい値を持った複合材料が合成できるようになる。現在は市販されている多層カーボンナノチューブの種類も多くなっている。これまで発表されている論文では、セラミックス複合材料の性質への異なる多層カーボンナノチューブの影響を調べているものはない。多層カーボンナノチューブの種類が複合材料の性質を左右するのはありうることである。この点も検討すれば複合材料の性能をさらに向上できるようになると考えている。

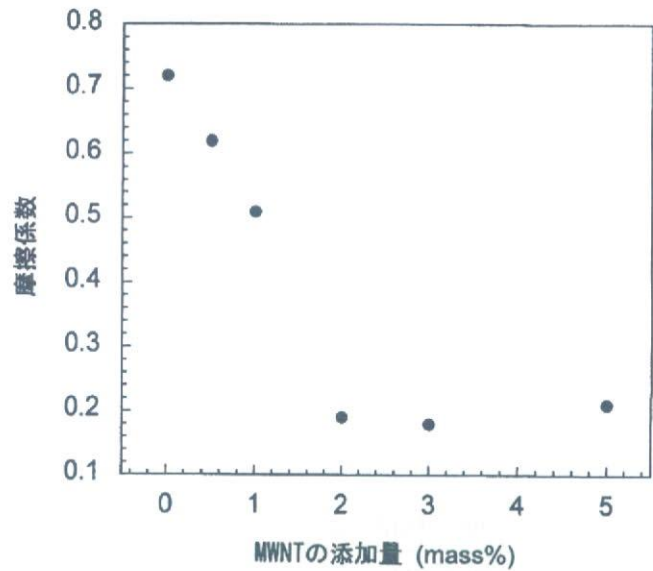


図5 MWNTの添加量と複合材料の摩擦係数の関係

チタン合金の水素吸収と諸問題

徳島大学大学院HBS研究部

○ 浅岡 憲三

1. ナノ微粒子の体内動態

人工関節・人工骨では、体内に移植されたインプラントのフレッチング摩耗により微粒子が生成し、その微粒子の組織、細胞に及ぼす為害作用が原因となり、インプラントが脱落することが検証されている (NJ Hallab, JJ Jacobs and JL Katz: *Application of Materials in Medicine, Biology, and Artificial Organs in Biomaterials Science 2nd Ed. ELSEVIER 2004, p. 544.*)。他方、最近 消化器系、循環器系、泌尿器系、呼吸器系などの器官を対象としたステントやカテーテルが注目され、臨床の場で利用され始めている。こうした機器ではNi-Ti超弾性合金が用いられることが多い。また、機器の部材は、その寸法が極めて小さく、細く、そして体内の多様な厳しい環境下での機能と耐食性、強度、寿命に対する高い信頼性が要求される。こうしたことから、工業分野と同じ規格では対応が不十分であるとの議論がありASTM F04で新たな規格制定へ向けた総合的な討論が始まっている。我々は、人工骨に対するチタン系合金のトライボロジーに対して、チタン系合金の水素脆性を研究対象とし、移植材料の機能、強度、寿命と水素との関係を調べてきた。この中で、人工骨に対する摩耗粉の問題と同様、チタン系合金の水素吸蔵に関して微粒子が生じる可能性が見いだされた。

2. Ni-Ti超弾性合金の水素吸収と機械的性質の変化

超弾性Ni-Ti合金線は、歯科矯正治療材料として一般的に利用されている。この合金は、口腔内に矯正装置として装着するときはしなやかであるが、口腔内で脆性破壊したり、撤去時にしなやかさが失われていたりすることが知られている。我々は、この原因が合金の水素脆性にあることを指摘し、合金に水素をチャージして機械的性質を調べ、その因果関係を明らかにした(図1)。ここで明らかにされたように、超弾性Ni-Ti合金は水素を吸収すると、変態が生じる応力が高くなる。さらに水素量が多くなると、破壊強度は低下する。

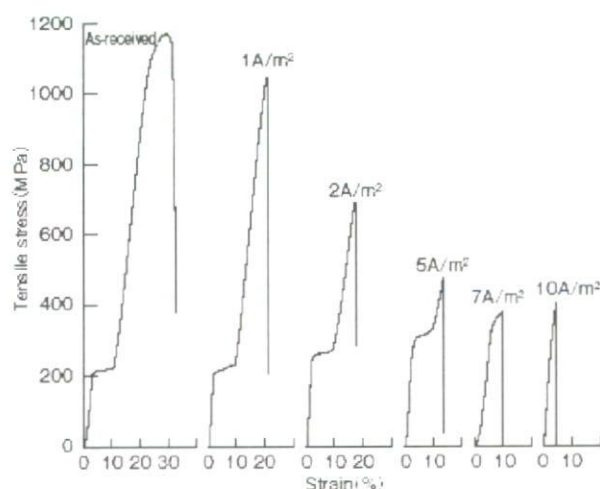


図1 図中の電流を24時間流し水素をチャージしたNi-Ti超弾性線の応力-ひずみ曲線

臨床の場で利用されるNi-Ti超弾性合金は、多くの場合、応力を受けた状態または強制ひずみを受けた状態で利用されている。したがって、どのような応力状態（合金組織）のときに水素が吸収されやすいか、あるいは吸収された水素が材料の環境あるいは合金内でどのような挙動をとるかは合金の変形、強度、寿命と関係した興味ある問題である。そこで、図2に示すように応力を受けた状態の合金試料に水素をチャージする方法で、超弾性変形の各ステージでの水素吸収量を調べた。その結果、図3に示すように変態した後のマルテンサイト相で水素吸収が速いことが明らかになった。また、吸収された水素は、室温では環境中には放出されず、材料中に拡散し濃度分布が徐々に均一化していることがわかった。

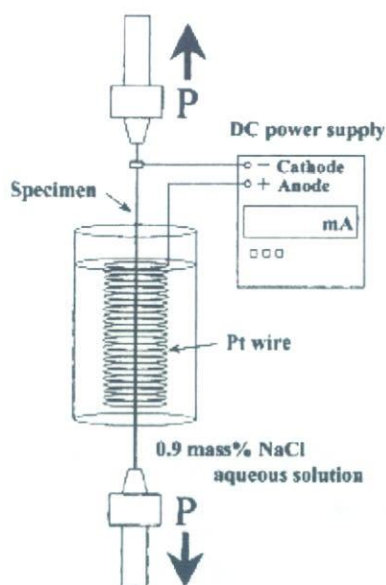


図2 引張荷重下での水素チャージ方法

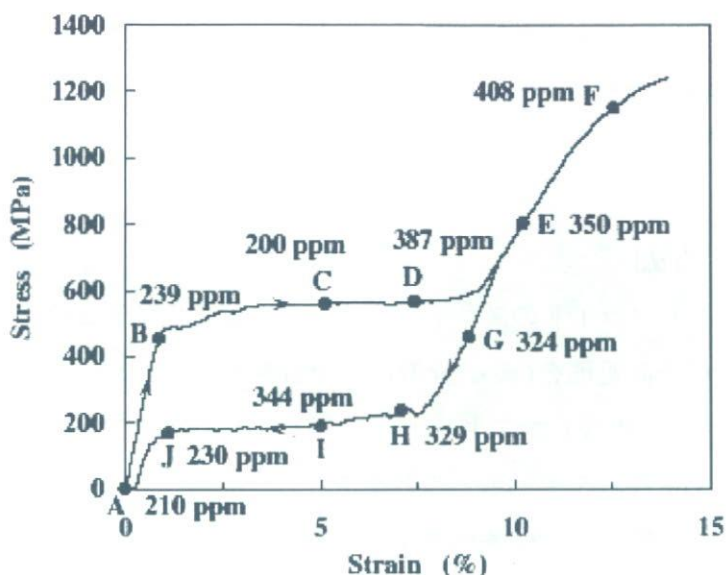


図3 強制ひずみを与えた状態で $10A/m^2$ で2時間水素をチャージした合金中の水素吸収量（昇温脱離分析法により測定）

3. 水素チャージと微粒子の生成

合金への水素のチャージと組織、機械的性質を測定する中で、電気化学的には水素発生型の陰極にある試料から、腐食生成物の微粒子が生じていることが確認された。そこで、定電流発生装置により、0.9%NaCl水溶液中で、陽極を白金電極とし、Ni-Ti合金、SUS316L合金、純チタン、それぞれを陰極とし、電流を流した後の溶液中の微粒子について調べた。その結果、Ni-Ti合金では黒色の微粒子が多量に生じ、SUS316L合金でも赤みを帯びた微粉が生じた。しかし、チタンでは肉眼的には溶液に変化がなかった。今後、生体内の移植器具が水素を吸収する過程で腐食生成物などの微粒子を生じる可能性を検証し、微粒子の組成の同定、粒度分布解析などと同時に微粒子の細胞毒性について検討する予定である。

Imogolite上での細胞培養

所属・氏名

北海道大学大学院 歯学研究科 口腔機能学講座 小児・障害者歯科学教室

○石川紘佑・赤坂司・八若保孝・亘理文夫

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

1. [目的]

イモゴライトは高い比表面積および保水性を有するアルニウム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、合成イモゴライトを用いてスキャホールドを作製し、生体親和性評価の1つとしてイモゴライト上での細胞培養を検討した。

2. [方法]

イモゴライトのスキャホールドの作製は、イモゴライトを塩酸（1M, 0.1M, 0.01M）中に添加して超音波処理を行い、分散液を吸引濾過することによって濾過膜上にシート状イモゴライトを形成させた。作成したスキャホールド表面粗さ測定を行った。

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、SEMにて細胞形態観察と、細胞数計測を行った。イモゴライトの形態観察は、SEMおよびTEMにて行った。

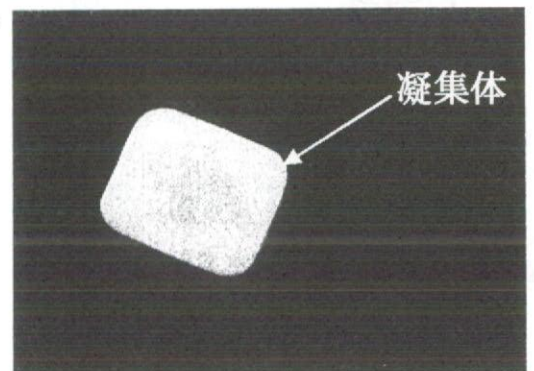


Fig1. イモゴライトSEM像

3. [結果および考察]

スキャホールド上にて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ポリスチレンディッシュと比較したところ、ほぼ同等な良好な細胞増殖が認められた。

一方で、イモゴライト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。

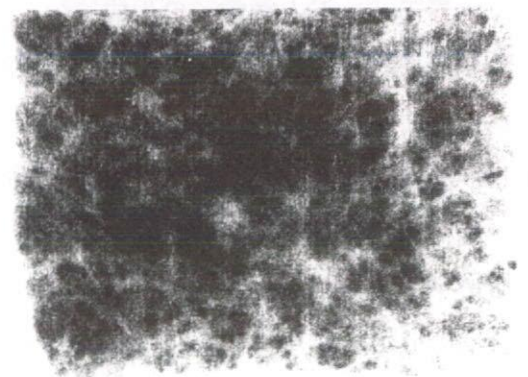


Fig2. イモゴライトTEM像×50000

以上の結果より、イモゴライトは、短期的に強い毒性は示さず、細胞接着・増殖に対し良好な材料である可能性が示された。

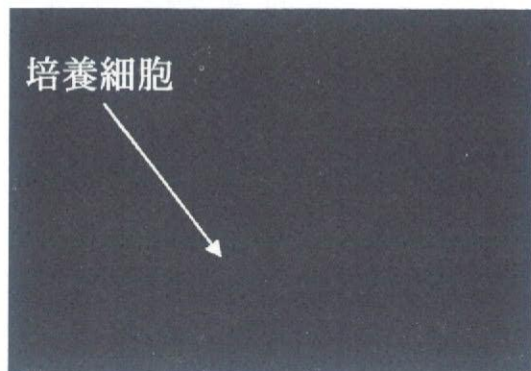


Fig3. スキャホールド上の培養

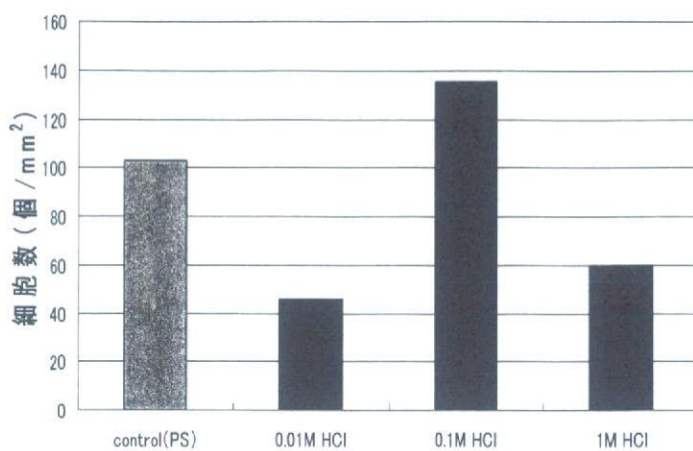


Fig4. Imogoliteスキャホールド上での細胞培養
(3日間)

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

○ 天雲太一、菅谷 勉、宮治裕史、田中陽、福田寛恵、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生体理工学教室

宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫

1. 目的

歯は口の中に露出している歯冠部と、歯肉、骨に埋入している歯根部に分けられる。歯根は骨の中に埋入しているが骨と直接接しているわけではなく、歯根膜という靭帯に類似した組織によって結合しており、さらに歯根膜と歯根の象牙質とはセメント質という骨に類似した組織によって結合している。歯周病は、これらの歯を支えている組織が炎症によって徐々に破壊され、やがて歯が動揺して脱落する疾患で、日本人が歯を失う原因の約半分が歯周病とされている。歯周病で失われた骨、歯根膜、セメント質を再生する治療法は、現在でもいくつかの方法が臨床応用されているが、抜歯せざるを得ない進行した歯周病では、機能を回復するほど十分な量の組織が再生できないのが現状である。

そこで我々はより多くのセメント質を象牙質表面に再生する目的で、bone morphogenetic protein (BMP) を用いて研究を行ってきた。これまでの研究で、象牙質表面を脱灰してBMPを塗布し、その上で線維芽細胞を培養すると付着した細胞の石灰化能が上昇し、象牙質表面にBMPが付着して機能することが明らかとなった。さらに、BMPを塗布した象牙質片を口蓋結合組織内に移植すると、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されるとともに象牙質表面に吸収窩が観察され、ビスフォスフォネートを投与すると、象牙質の吸収が減少するとともに、硬組織形成も抑制されることが明らかになり、BMP-2の硬組織誘導作用は直接骨芽細胞を活性化するより、破骨細胞を活性化してカップリングを向上させる作用の方が大きいと考えられた。また、BMPを根面に塗布する際に前処置として行う象牙質の脱灰液の種類が異なると、硬組織形成と象牙質吸収に影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、硬組織の形成と象牙質の吸収が同一の組織標本のきわめて近傍で観察されたことから、さらに歯根表面のきわめてわずかな性状の違いなど、他の要因が関与している可能性が高いのではないかと考えている。そこで本研究ではナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を使い、Caの含有量の違いがBMPの活性に影響を与えるかを検討するため、その第一段階として精製したナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の物性と細胞毒性を検討した。さらに、精製したナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜にBMPを含有させ、ラット皮下及び筋内に移植し、硬組織の形成を軟X線検査にて観察した。

2. 実験方法

1) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の精製

Bradtらの方法に従い⁹⁾精製した。アテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸1型コラーゲンを精製し、中性リン酸buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) を加え、さらに CaCl_2 を9mMになるように加え、37度で12時間インキュベートした。その後、吸引濾過し、1%EDC (1-エチル・3-カルボジイミド塩酸塩) で1時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗、凍結乾燥した。また、 CaCl_2 の濃度を6.75mMにしたものも精製し、FTIR検査およびSEMで微細構造を観察した。

2) 細胞毒性試験

1) で精製したナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜 (以下nHAP) 表面にラット線維芽細胞様細胞MC3T3-E1を細胞数が 1×10^5 個/mlになるように培地 (D-MEM+10%FBS) に分散し、24穴ウェル中に1mlずつ滴下した。3時間、1、3日間培養し、ギムザ染色を行い、光学顕微鏡下で細胞数のカウントを行った。

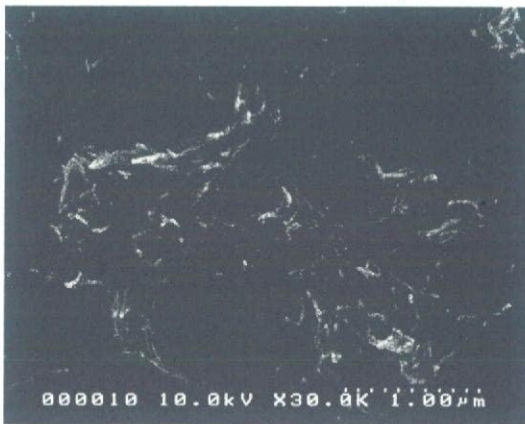
3) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のBMP活性への影響：軟X線検査

CaCl_2 の濃度を9mM及び6.75mMで作製したnHAP-コラーゲン複合体膜を【 $4 \times 4 \times 0.01\text{mm}$ 】にトリミングし、 $10 \mu\text{g/ml}$ のリコンビナントヒトBMP-2 (R&D) またはPBSに10分間浸漬し、全身麻酔下にて、ウイスター系雄性ラット (8週齢) の皮下結合組織および大腿筋内に移植、縫合した。

2週の観察期間後、10%ホルマリン固定し、軟X線写真にて観察した。

3. 結果

1) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のSEM形態



9mM CaCl_2



6.75mM CaCl_2

ともにナノサイズのハイドロキシアパタイト粒子が観察された。9mM CaCl_2 は膜全面に均一なアパタイト粒子が観察され、コラーゲンはほとんど観察されなかった。一方、6.75mM CaCl_2 では均一なアパタイト粒子が散在し、コラーゲンの露出が多く観察された。