

そこで、本研究協力者は、生体とのかかわりを検証するための代表的なナノ粒子を製造し、いくつかの試験をすることを旨とした。

本年度は、生体とのかかわりを検証する上で必要となるナノ粒子について製造・開発した。その内容は3種類であり、①生体関連の高分子をナノ粒子周囲に吸着する保護剤として用いた場合、②生体適合性のよい有機酸を保護剤として用いて水中に分散させた粒子径の比較的大きな金属ナノ粒子、③こうした保護剤を表面にもたず、なおかつ水中で分散することのできるナノ粒子である。これらの粒子の研究成果について報告する。

また、さらに進めて後年度では、新しく、質量分析へナノ粒子の応用展開を試みることにした。生体関連物質の質量分析のためのイオン化を行うために、高分子量領域の分析が得意なレーザー脱離イオン化(LDI)法を用いることにした。一般に、LDIはハードイオン化であるため、レーザー光を吸収し、脱離・イオン化を促進するフェニル環をもった、マトリクス分子を添加する。これをマトリクス支援LDI(MALDI)法といい、ソフトイオン化法の代表例のひとつである。(ソフトイオン化とは分子を分解しないでイオン化する方法)しかしながら、MALDI法では、マトリクス分子の添加が必須であることや、マトリクス分子と試料分子が共晶をつくり、その周囲において脱離・イオン化が大きく促進されることから、「スイートスポット現象」(感度の高い点と低い点があり、均一にイオン化することができない)が見られる。また、MALDI法は、試料にとってはソフトイオン化法であるが、マトリクス分子にとってはハードなイオン化法であって、マトリクス分子が分解し、様々な雑ピークを呈してしまう欠点がある。そこで、脱離・イオン化を促進するシステムとして、表面支援LDI法(SALDI法)がある。最近、このSALDI法のためのサンプル基板として、ナノ粒子を塗布した基板が用いられてきている。特に、微細な凹凸をもたせた基板が脱離・イオン化に有効であるので、本研究では、異方性の粒子を用いてSALDI法を行うことを試みた。その結果について本報告で述べる。

B. 研究方法

ナノ粒子の製法は個々の事例に適切なものを選択

した。その結果、いずれの方法の湿式法が選択された。

①については、保護高分子としてゼラチンを用い、 NaBH_4 を還元試薬として用いた方法である。②については、クエン酸を還元試薬とし、保護分散もこのクエン酸が担っている(DLVO)。③保護剤は使用せず、レーザーアビュレーション法によってナノ粒子を生成させた。④適切な還元剤によって保護剤を使用せずナノ粒子を調製した。

いずれの粒子についても、粒子径・形状などについては、透過型電子顕微鏡・走査型電子顕微鏡観察によって行い、それぞれに対応した分析方法によって分析した。

また、産業応用としてナノ粒子をSALDI-MS基板材料として応用した。まずは、金属の特性をみるために、保護剤をもたせずに安定に分散させることができるレーザーアビュレーション法によるナノ粒子の合成を使い、SALDI-MS用サンプル基板を作製した。また、化学還元法では、(a)塩化白金酸を激しく攪拌しながら水素化ホウ素ナトリウムによって一気に還元する方法、もしくは(b)塩化白金酸を穏やかな還元剤であるギ酸を用いて、混合・放置によって還元した(*Adv. Mater.*, 2008)。得られたナノ粒子分散液をメンブレンフィルターでろ過し、十分に精製水で洗浄して、表面のコンタミネーションを十分除去した。

白金は活性であるため、有機溶媒をもちいることは難しいことは注意点である。

質量分析器は、島津/KRATOS製AXIMA-CFRを用いた。UVパルスレーザーを照射し、サンプルを脱離・イオン化する。サンプルはステンレス製サンプルプレート上に、SALDI用無機ナノ粒子分散液を塗布し、イオン化促進剤としてクエン酸を添加、サンプルを滴下して乾燥して、観察を行った。

CD. 研究結果と考察

本研究においては、まず、生体関連高分子に保護されたナノ粒子の作製にトライした。①の生体関連高分子としては、ナノ粒子の保護・分散剤として古くから検討されているゼラチンを用いて、まず最初に微細な酸化鉄粒子を合成した。ゼラチンは、生体から取り出せるポリペプチドであって、その分子内および分子間水素結合により様々な2次構造を取る

ことが知られており、今後、様々に応用が期待される高分子である。

具体的には、塩化鉄(III)を原料とし、保護高分子たるゼラチンの存在下、水素化ホウ素ナトリウム溶液を滴下して、ナノ粒子分散液を調製した。Fig. 1 に得られたTEM写真を、また、Fig. 2 にその写真から観察した粒子径分布を示す。平均粒子径は、2.8 nm で、均一な粒子径分布を持っている。また、このナノ粒子を基板上に分散・塗布し、その表面をAFM観察したところ、Fig. 3 のようにその高さは平均粒子径よりも大幅に高く、18 nm に達していた。このことから、非常に厚い有機分子シェルがナノ粒子をコアにして包み込んでいることが分かる。こうしたナノ粒子は生体親和性が極めて高いことが十分に期待される。また、X線回折測定により、水素化ホウ素ナトリウムを用いたが、このナノ粒子は鉄の酸化物であり、主にマグネタイトであることが分かった。これは、水素化ホウ素ナトリウムのもつ還元的雰囲気と、添加した溶液のアルカリ性によって生成したものであると考えられる。こうして得られた酸化鉄ナノ粒子はSQUID測定の結果、超常磁性であることが示された。実際、得られたナノ粒子は粉末状態においてFig. 4の通り、希土類磁石に反応し、サンプル瓶内において、磁石に着くことが分かった。一方、同様の手法でナノ粒子を低温(20℃)で合成したところ、磁石には反応しなかった。これはゼラチンが分子状とはならず、上手く保護できずにいるのも一つの原因かと考えられる。

また、従前より研究協力者らは、ポリペプチドの末端に硫黄部位を持つ分子を合成し、ナノ粒子の保護剤として用いていた。例えば、D,L-リポ酸を末端基として合成したPBLG(ポリベンジルグルタメート)は、(以下Lipo-PBLGと略す)を使用して金ナノ粒子を合成したところ、Lipo-PBLGは優れた保護能を示し、ナノ粒子上に単分子膜を形成したと思われる。このようにポリペプチドはそれ自体をナノ粒子の保護高分子として利用できるほか、金属配位部位を持たせて、単分子膜様に保護することも可能であることが分かった。

②の生体適合性のよい有機酸として本研究ではクエン酸を用いて比較的粒子径の大きなナノ粒子の調製を行った。高濃度の硝酸銀溶液にクエン酸を加えて煮沸することでナノ粒子を得ることができた。得

られた分散液は透明ではなく懸濁しており、部分的に凝集・沈殿も見られるが、沈殿部以外をもって、処理をした。

処理は、粒子径よりも大きなフィルターを通すことによってナノ粒子を得る手法である。金や銀ナノ粒子は比較的粒子径が大きくなると、平板状やロッド状の粒子など異形状の粒子が多く見られるようになることが分かっている。本手法によって調製された銀ナノ粒子の中にも、必ずしも球形ではなく、異方性の高い粒子が散見されたので、ろ過によってナノ粒子の精製を行うこととした。

添加したクエン酸を除去するには、限外ろ過膜(また、限外ろ過用中空糸膜)を通してイオンを取り除く方法が有効であることは既に分かっているが、大きな粒子の形状を整える手法は不明であった。当初、ナノ粒子に不要なコンタミネーションを入れない目的で、水溶性物質であれば、ポアサイズが0.2ミクロンの親水化したPTFEを用いてろ過をした。ものを用いた。その結果、得られた粒子は約70nmの粒子径をもっているが、異方性のある粒子が多く見出された。(Fig. 5)

そのため、円状のポアだけを有する0.4ミクロンのフィルターを用いてろ過した。その結果、得られた銀ナノ粒子は図7の通り、球状のものが多かった。

今後、クエン酸還元大型銀ナノ粒子を用いて生体内に導入した後、その粒子の存在を追跡し、可動状況を知ると共に、リスク評価を行って行きたい。最初の試験として、1匹/Lの金魚水槽の中に10mg/Lの濃度で添加し、2日ごとにコロイド分散液を交換し6日暴露したところ、腸壁に銀ナノ粒子がついている状態が観察された(Figs. 6,7)。

さらに、保護剤を添加せず、金属の表面を裸のまま分散させるナノ粒子の作製を目指した。製造法としては、ピュアなナノ粒子を得るための製造法として最適な、インゴット(金属板)からのレーザーアブレーション法を利用した。このとき、レーザーエネルギーが拡散するため、比較的強度の高いエネルギーが必要である。

こうして得られた金・白金ナノ粒子は安定で分散状態を保持していたが、白金は数日で沈殿となってしまうことが分かり、金ナノ粒子は非常に安定に保持されていた。こうした無機表面がむき出しの場合にどういった表面挙動が起きるのか、体内動態が生

じるのかについても非常に興味深いと思われる。

一方で、我々は金属ナノ粒子の SALDI-MS への応用展開について検証した。

まず、最初に作製した金属ナノ粒子は、金、銀、銅、白金である。作製には不純物を含みにくいレーザーアビュレーション法を用いた。得られた結果として、金と白金のみが、良好な SALDI-MS 特性を示し、銅、銀は不適であった。酸化銅は SALDI-MS 特性を有していたことから、この結果は、金属の熱伝導性によるものであらうと考えられる。白金は他の金属に比べ熱伝導率が極めてにくいいため、レーザーが当たった後、その表面が急速に昇温し、脱離・イオン化が促進されると理解される。一方で、銅は熱伝導率が高く、酸化銅は低いため、このような結果になったものと思われる。

そこで、さらに白金ナノ粒子に異方性を持たしたものを作製した。

(a)法である水素化ホウ素ナトリウムによって塩化白金酸を還元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。Fig. 8 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、Fig. 8 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。

(b)法であるギ酸還元で得られた白金ナノ構造体の SEM 写真を Fig. 9 に示す。フィラー状の白金ナノ構造体を得られており、白金の高結晶性が生かされた材料ができあがっている。その太さや長さはほぼ一定であることが見て取れる。こうしたナノ粒子は、イオン液を常温で静置することによって可能であって、攪拌したり加熱した場合には、球状粒子ができ

てしまう。このようにして得られた白金ナノ構造体を水に分散させて利用した。アルコールなどに分散する場合には、白金の活性が高いと発火する場合もあるので注意が必要である。

双方とも生体関連物質をよく脱離・イオン化させるが、後者の白金ナノ構造体がよく働いた。それによって得られた質量スペクトルの例を Figs. 10, 11 に示した。対象の生体関連物質として、ペプチド/タンパク質のアンジオテンシン I、サブスタンス P、ヒトインスリン、トリプシノーゲンなどを観察を行った。いずれも良好な脱離・イオン化が起こることが示された。低分子量領域にもあまり目立った不純物ピークが見られず、クエン酸の添加によって、イオン化も促進され、アルカリ金属イオンのピークも減少した。

また、スイートスポット現象も有機マトリクスを用いた場合よりも小さい場合が多いことがわかった。このように、異方性構造を持つ白金を用いた SALDI は効率がよいことが示された。

また、このように MALDI に比べ利点の多い SALDI-MS 法であるが、欠点もある。SALDI 法はこれまで高分子のイオン化に適していないとされてきた。というのも、折角ナノレベルで凹凸を基板上に作ったとしても、高分子であると多点で表面に吸着するので脱着が難しいという点である。しかしながら、本研究で得られた白金ナノ構造体では、Fig. 11 の通り、トリプシノーゲンも良好にイオン化できることがわかった。

E. 結論

生体と無機ナノ粒子のかかわりに関する研究を行った。様々な表面を有したナノ粒子を調製することが可能であり、また、その大きさも広い範囲で制御できることが明らかとなってきた。

①ナノ粒子表面の形状、状態と②ナノ粒子の大きさと形の 2 つが生体と大きくかわることは容易に予想できるはずである。本研究補助者は、応用の観点からこの 2 つの制御にこれまで長く従事してきた。今回は、ナノ粒子の SALDI-MS を展開したところ、金および白金ナノ粒子が良好な SALDI 特性を示し、さらに、細い白金ナノ構造体を作製することによって、効率よく生体関連物質のイオン化が可能となった。また、高分子量の物質のイオン化にも対応可能

となり、今後、タンパク質などの高効率イオン化への応用が強く期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tetsu Yonezawa, Nomura, Masayoshi Tanaka, Takatoshi Kinoshita, "Preparation and Characterization of Polypeptide-stabilized Gold Nanoparticles", *J. Nanosci. Nanotech.*, **6(6)**, 1649-1654 (2006).
2. Yoshinori Yamanoi, Naoto Shirahata, Tetsu Yonezawa, Nao Terasaki, Noritaka Yamamoto, Yoshitaka Matsui, Kazuyuki Nishio, Hideki Masuda, Yuichi Ikuhara, and Hiroshi Nishihara, "Detailed Structural Examinations of Covalently Immobilized Gold Nanoparticles onto Hydrogen-terminated Silicon Surface", *Chem. Eur. J.*, **12(1)**, 314-323 (2006).
3. Nao Terasaki, Noritaka Yamamoto, Kaoru Tamada, Mineyuki Hattori, Takashi Hiraga, Akihiko Tohri, Ikutaro Sato, Isao Enami, Yasunori Inoue, Yoshinori Yamanoi, Tetsu Yonezawa, Masaki Murata, Hiroshi Nishihara, Satoshi Yoneyama, Makoto Minakata, Tsutomu Ohmori, Makoto Sakai and Masaaki Fujii, "Bio-photosensor: Cyanobacterial Photosystem I Coupled with Transistor via Molecular Wire", *Biochim. Biosci. Acta*, in press.
4. Tetsu Yonezawa, Keigo Kamoshita, Masayoshi Tanaka, and Takatoshi Kinoshita, "Preparation of Stable Iron Oxide Nanoparticles using Gelatin as Stabilizing Molecules", to be submitted.
5. 米澤 徹, 金属ナノ粒子の配列固定化と機能, 未来材料, **7(3)**, 44-49 (2007).
6. 米澤 徹, 「金属クラスター集積薄膜」, 関 隆広 監修 「機能物質の集積膜と応用展開」, シーエムシー出版, 東京, pp. 119-125 (2006).
7. 米澤 徹, 「金属ナノ粒子の種類, 合成法分類と基本的な物性」, 菅沼克昭監修 「金属ナノ粒子ペーパーストのインクジェット微細配線」, 第1編・第2章, シーエムシー出版, 東京, pp. 7-19 (2006).
8. 米澤 徹, 「小さな配位子に保護された金属ナノ粒子」, 菅沼克昭 (阪大産研) 監修 「金属ナノ粒子ペーパーストのインクジェット微細配線」, 第1編・第3章 8, シーエムシー出版, 東京, pp. 70-74 (2006).
9. Tetsu Yonezawa, "Wet preparation of metal nanoparticles and their immobilization on silicon substrates" in "Metal nanoclusters in catalysis and materials science: the issue of size-control: Part II Methodologies", ed. by Benedetto Corain, Günter Schmid, Naoki Toshima, Elsevier, in press.
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. 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.
16. 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.
17. N. Terasaki,* N. Yamamoto, T. Hiraga,* Y. Yamanoi, T. Yonezawa, H. Nishihara,* T. Ohmori, M. Sakai, M. Fujii,* A. Tohri, M. Iwai, Y. Inoue, S. Yoneyama, M. Minakata, and I. Enami, "Plugging a Molecular Wire

- into Photosystem I for Reconstitution of the Photoelectric Conversion System on a Gold Electrode”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press (2009).
18. **T. Yonezawa**,* H. Kawasaki, A. Tarui, T. Watanabe, R. Arakawa, T. Shimada, and F. Mafuné, “Detailed Investigation on Possibility of Nanoparticles of Various Metal Elements for Surface-Assisted Laser Desorption/ Ionization Mass Spectrometry”, *Anal. Sci.*, in press (2009).
 19. I. Nakamura, Y. Yamanoi, **T. Yonezawa**, T. Imaoka, K. Yamamoto, and H. Nishihara*, “Nanocage Catalyst – Rhodium Nanoclusters Encapsulated with Dendrimers as Accessible and Stable Catalysts for Olefin and Nitroarene Hydrogenations”, *Chem. Commun.*, **2008(44)**, 5716-5718.
 20. **T. Yonezawa**, K. Uchida, Y. Yamanoi, S. Horinouchi, N. Terasaki, and H. Nishihara*, “Room-Temperature Immobilization of Gold Nanoparticles on Si(111) Surface and Their Electron Behaviour”, *Phys Chem Chem Phys*, **10(46)**, 6925-6927 (2008).
 21. M. Miyachi, Y. Yamanoi, **T. Yonezawa**, H. Nishihara, M. Iwai, M. Konno, M. Iwai and Y. Inoue, “Surface immobilization of PSI using vitamin K₁-like molecular wires for fabrication of a bio-photoelectrode”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 1714-1718 (2008).
 22. M. Nakai, Y. Yamanoi, Y. Nishimori, **T. Yonezawa**, H. Nishihara*, “Observation of Electrochemical Single Electron Transfer Events of Au Nanoparticles in Aqueous Solutions in the Presence of Both Amine and Sulfonate Surface-active Agents”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47(35)**, 6699-6702 (2008).
 23. A. Tarui, H. Kawasaki, T. Taiko, T. Watanabe, **T. Yonezawa**, and R. Arakawa, “Aggregated gold-nanoparticle-supported silicon plate with cationic diblock copolymer micelles for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, in press.
 24. H. Kawasaki, T. Sugitani, T. Watanabe, **T. Yonezawa**, H. Moriwaki, R. Arakawa, “Layer-by-layer Self-Assembled Multilayer Films of Gold Nanoparticles for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry”, *Anal. Chem.*, **80(19)**, 7524-7533 (2008).
 25. M. Tomonari, K. Ida, H. Matsushita, and **T. Yonezawa**, “Size-Controlled Oxidation Resistant Copper Fine Particles Covered by Biopolymer Nanoskin”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **8(5)**, 2468-2471 (2008).
 26. T. Watanabe, H. Kawasaki, **T. Yonezawa**, and R. Arakawa, “Surface-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) of Low Molecular Weight Organic Compounds and Synthetic Polymers Using Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles”, *J. Mass Spectrom.*, **43**, 1063-1071 (2008).
 27. N. Shirahata, **T. Yonezawa**, Y. Matsushita, Y. Masuda, K. Koumoto, “Fusion and Growth Behavior of Gold Nanoparticles Stabilized by Allylmercaptane”, *Macromol. Symp.*, **270**, 82-87 (2008).
 28. **米澤 徹**, 「金ナノ粒子の調製」、春田正毅監修 「金ナノテクノロジー:その基礎と応用」(仮題)、シーエムシー出版、東京 (印刷中)
 29. **米澤 徹**, 「微粒子の生体影響」、「ハイブリッド微粒子」、「現代界面コロイド化学の基礎」内、「第4章 微粒子 — 第4節 微粒子の特殊な機能と性状」、日本化学会編、丸善、東京 (印刷中)
 30. **米澤 徹**, 「金属ナノ粒子の湿式合成とその応用」、ケミカルエンジニアリング、**53(8)**, 583-587
- ## 2. 学会発表
1. 鴨志田、**米澤 徹**、田中正剛、木下隆利、「安定な第一周期遷移金属ナノ粒子の湿式合成」、高分子年次大会、3Pd066、2006.5.26、名古屋国際会議場。
 2. **米澤 徹**、西原 寛、「金属ナノ粒子の湿式調製と精製」、第3回「ナノトコ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 13、2006.12.11、仙台ワシントンホテル。
 3. **米澤 徹**、日本化学会第87春季年会 特別講演「貴金属・遷移金属ナノ粒子の湿式製造と応用展開」、2007.3.28、関西大学。
 4. Keigo Kamoshita, **Tetsu Yonezawa**, Masayoshi Tanaka, and Takatoshi Kinoshita, “Preparation and Property of Magnetite Nanoparticles Stabilized by Gelatin”, Fourth International Conference on Molecular Electronics and

- Bioelectronics (M&BE4), 1P_66, Tokyo (2007.3).
- 米澤 徹, 「高分散金属ナノ粒子の調製と応用展開ーシングルナノからサブミクロンまでの材料づくり」、表面技術協会ナノテク部会第 13 回研究会 (招待)、2006.7.11、東京大学。
 - Tetsu Yonezawa, "Supramolecular approach for arrangement and immobilization of metal nanoparticles", Asia Academic Seminar "Molecular and Supramolecular Materials with Designed Functions", 2007.2.26, Pune, India (National Chemical Laboratory). (Committee Member)
 - 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)
 - 藤田真士、荒井重勇、齋藤徳之、米澤 徹、黒田光太郎, "種々の基板上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)
 - 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).
 - 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).
 - 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).
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - H. Kobayashi, K. Takeda, T. Yonezawa, "Solid-State ¹⁹⁵Pt NMR Measurements of Pt Nanoparticles Protected by Organic Materials" 49th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (2008/3, California)
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - 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トル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)
 - 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",
 - 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).
 - 劉 洋, 八井 崇, 米澤 徹, 大津元一, 「量子ドット列を用いた近接場光伝送路の開発」, MesoMolSys 研究会 (東京) 第 1 回・夏季セミナー 2008 (2008.9.5)
 - 川崎 英也, 杉谷 剛, 渡辺 健宏, 米澤 徹, 荒川 隆一, 「表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (SALDI-MS) のため金ナノ粒子/高分子交互吸着シリコン基板」, 第 61 回コロイドおよび界面化学討論会 (福岡・九州大学 六本松) 1F11 (2008.9.7)
 - 米澤 徹, 荒井重勇, 竹内宏典, 上野武夫, 黒田光太郎, 「銀ナノ粒子の調製と高温その場観察」, 第 61 回コロイドおよび界面化学討論会 (福岡・九州大学 六本松) 2C05 (2008.9.8)
 - 米澤 徹, 竹岡伸介, 岸弘志, 井田清信, 友成雅則, 「銅粒子を内部電極材料とした MLCC の作成」, MES (Micro-Electronics Symposium) 2008 (京都・京都大学) 1C13 (2008.9.18)
 - 米澤 徹 (依頼発表), 「高分子が制御する無機ナノ粒子の構造・機能」, 第 57 回高分子討論会 (大阪・大阪市立大学) 2E14 (2008.9.25)
 - H. Nakatani, K. Miyazaki, H. Shibata, T. Yonezawa, H.

- Takeda, Y. Azuma, S. Watanabe, Studies on local degradation behavior of polypropylene/talc composite, 7th International Symposium on Weatherability (ISW) (横浜・関東学院大学) (2008.10.12)
28. 米澤 徹、「ナノ構造の新しい作製技術とその応用」、第16回ナノフォトニクスオープンセミナー(東京大学) (2008.11.6)
 29. 中谷久之、柴田 洋、米澤 徹、竹田英俊、東 泰、渡辺 真、「鉄系不純物がポリプロピレン/タルク複合材料の劣化挙動に与える影響」、2008年度高分子の崩壊と安定化研究討論会(東京・キャンパスイノベーションセンター) (2008.12.18)
 30. 浅野貴志、米澤 徹、藤野竜也、西原 寛、「包接マトリックスによる低分子薬物の質量分析」、日本化学会第89春季年会 1G6-34 (2009).
 31. 米澤 徹、荒井重勇、竹内宏典、上野武夫、黒田光太郎、「表面が清浄な銀ナノ粒子の調製と高温その場観察」、日本化学会第89春季年会、2L3-03 (2009).
 32. 米澤 徹、河合功治、西原 寛、「新規リガンドを用いた水分散性金コロイド」、日本化学会第89春季年会、2L3-13 (2009).
 33. 米澤 徹、「自己組織的なナノ粒子の制御固定 ～DNAなどを利用して～」春季 第56回応用物理学関係連合講演会(筑波・筑波大学)、シンポジウム「ナノフォトニクスにおけるナノ加工の最前線と理論基盤」(2009.3.30)

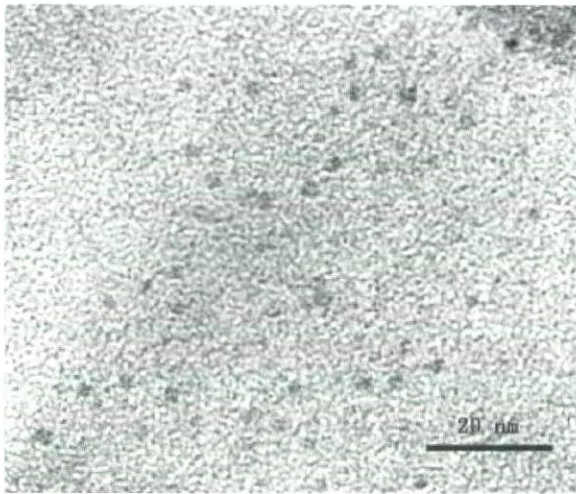


图 1

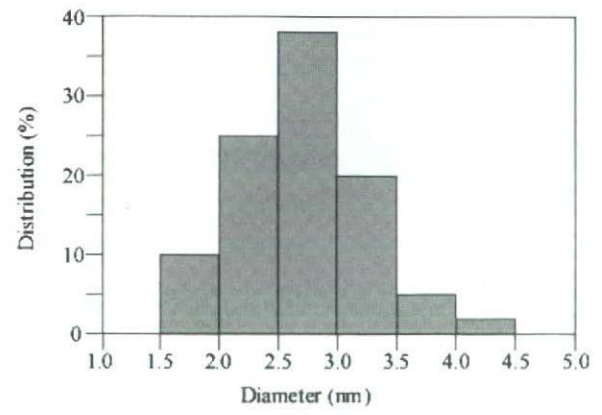


图 2

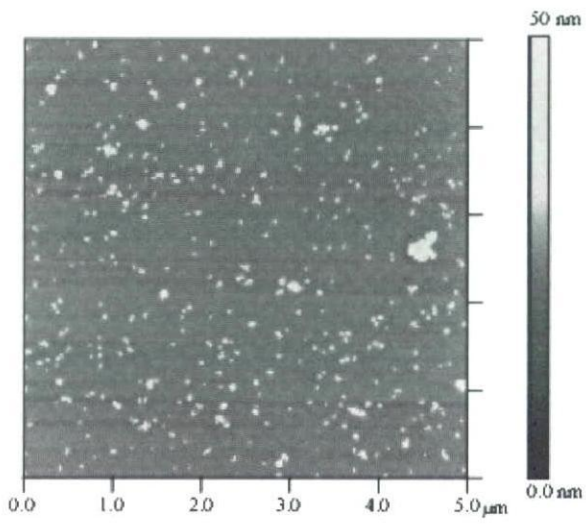


图 3

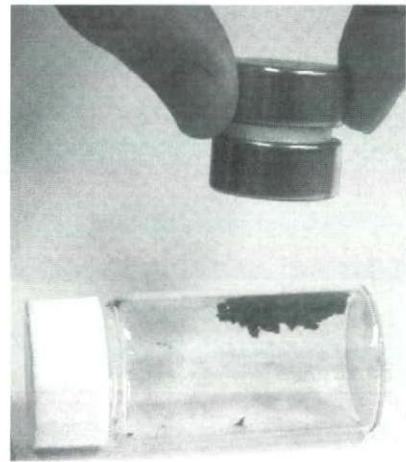


图 4



图 5

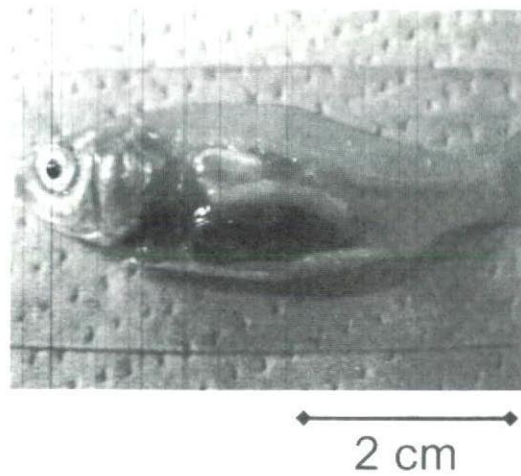


图 6

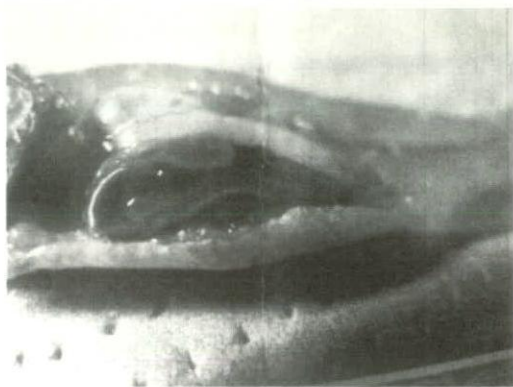


図 7

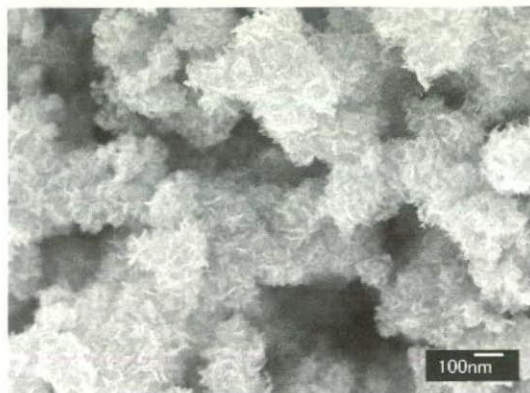


図 8



図 9

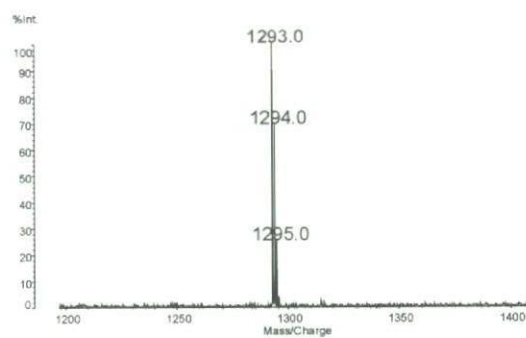


図 10

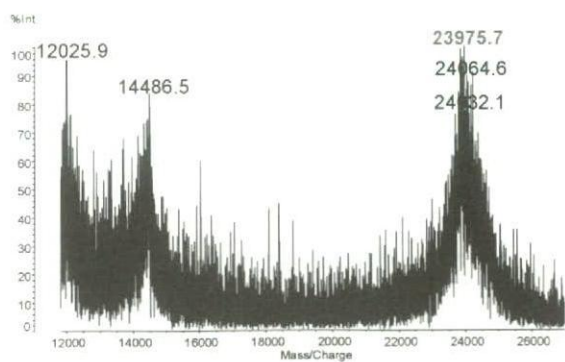


図 11

- 図 1 磁性酸化鉄粒子のTEM像
- 図 2 図 1 の粒子の粒子径分布
- 図 3 図 1 粒子のAFM像
- 図 4 希土類磁石をあてた
- 図 5 クエン酸還元による円形大型銀ナノ粒子
- 図 6 銀ナノ粒子に暴露した金魚
- 図 7 図 6 の金魚の腸管

- 図 8 (a)法で作製した白金ナノ構造体の SEM 写真
図 9 (b)法で作製した白金ナノ構造体の SEM 写真
図 10 アンジオテンシン I の質量スペクトル
図 11 トリプシノーゲンの質量スペクトル

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

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合金およびステンレス鋼を水素発生条件下で腐食させ、生成した微粉状の腐食生成物の状態をX線吸収微細構造(XAFS)解析により調査した。生理食塩水中の水素チャージにより、Ni-Ti合金中のチタンは酸化チタンを、ニッケルは水酸化ニッケル様の微粒子が生成することが判明した。さらに酸性条件下ではニッケルは沈殿物を形成せず、溶液中に溶出した状態で存在することが推定された。生成したニッケル水酸化物や溶出イオンは生体に為害性をもたらす危険性があり、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。ステンレス鋼は同じ条件下でも腐食生成物の量が少なく、生成した腐食生成物も水酸化鉄を主成分としており、同合金の耐食性の高さが確認された。

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Ni-Ti合金はその超弾性や形状記憶特性を生かして歯科矯正用ワイヤーやカテーテルガイド、ステントなど医療分野に応用されている。一般的には耐食性に優れるとされるNi-Ti合金であるが、生体内で水素吸蔵により腐食し、微粒子状の腐食生成物を生じる可能性が示唆されている。

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。また生理食塩水中などでNi-Ti合金を陰極として電気分解を行い、水素発生条件下で腐食させた同合金の腐食生成物のXANESスペクトルを測定し、腐食生成物の状態分析を行った。また比較のためSUS316Lを同条件で水素チャージ下で腐食生成物を発生させ、Fe, Ni, Crの状態を検討した。

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】

研磨したNi-Ti線(0.5mmφ)を陰極として、下記の条件で電気分解し、水素チャージ

を行い、発生した腐食生成物粒子を乾燥、デンプンで希釈、成形後にKEK-PF BL-9AにおいてTi及びNi K-edge XANESスペクトルを透過法で測定した。

・試料#1: 0.9% NaCl aq.; 電圧= 3V ~ 10V
まで0.1V/minで昇圧

・試料#2: 0.9% NaCl aq.; 電圧= 3V×24時間

・試料#3: 0.9% NaCl aq.をHCl添加によりpH2に調整; 電圧= 2V×24時間

また一部試料についてはSEM-EDS(日立S-2380およびEDAX Genesis)による元素分析を行った。

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。

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 $1\mu\text{m}$ 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】

得られたNiおよびFeのK-edge XANESスペクトルを図4に示す。またTi K-edge XANESスペクトルを図5に示す。通常、溶出したTiは酸化され、 TiO_2 を形成すると推測されるが、腐食生成物のスペクトルはanataseなどの通常の酸化物はやや異なるスペクトルとなり、 TiO_2 のLepidocrocite様の層状化合物(図2,3)に近いと考えられた。NaCl溶液中で電気分解を行っていることから、チタン酸ナトリウムの形成も考えられ、同化合物が図4のようなLepidocrociteに近い層状構造を持っており、XANESスペクトルも類似していることが知られている。SEM-EDSによる腐食生成物中のNa量の分析では、Tiに比べてNa量が少ないことから、チタン酸ナトリウムの可能性は低く、TiはLepidocrocite型の TiO_2 として存在すると推定された。また腐食生成物中のNiは主として水酸化物と推定され、一部酸化物の混在が推定された。

水素チャージする溶液を食塩水と塩酸酸性の食塩水で変化させた場合でもXANESスペクトルに大きな変化はなく、NiとTiの状態は電気分解する溶液によらず、ほぼ同様であると考えられた。また各吸収端における吸光度比は0.9% NaCl水溶液中で水素チャージした生成物ではNi/Tiの吸光度比が0.3~0.8であったのに対し、HClを添加して酸性とした場合にはNi/Tiが約0.03と極めてNiが少なく、酸性条件下でのNi-Tiの腐食生成物が TiO_2 主体であり、Niは水溶液中に溶解した状態であると推定された。SUS316LではFe、Niは水酸化物の状態で検出されたが、Crは腐食生成物からは検出されな

かった。また生成物量もNi-Ti合金と比較して極めて少なく、SUS316Lの高い耐食性が確認された。

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合金は形状記憶効果や超弾性効果などの独特な機械的特性を示すため、歯科矯正用ワイヤーやステントなど、医科・歯科用金属として広く用いられているが、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。

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。

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

3) Uo M., Asakura K., Tamura K., Totsuka Y., Abe S., Akasaka T., Watari F.: XAFS Analysis of Ti and Ni Dissolution from Pure Ti, Ni-Ti Alloy, and SUS304 in Soft Tissues, Chemistry Letters, 37 (9), 958-959, 2008

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)

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)

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

4) ○ Uo M., Yokoyama A., Watari F., The application

of X-ray scanning analytical microscope (XSAM) for the analysis of biological and dental specimens, 9th International Conference on X-ray Microscopy, Abstract of XRM2008, p.157 (Zurich, 2008/7/21-25)

5) ○ Uo M., Akasaka T., Tanaka I., Munekane F., Omori M., Kimura H., Watari F., Multi-wall Carbon Nanotubes Monolith prepared by Spark Plasma Sintering (SPS) and its mechanical property, International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (ISNT2008) (Sapporo, 2008/6/16-17)

6) ○ Uo M., Terada M., Akasaka T., Kitagawa Y., Watari F., Carbon nanotubes/collagen composite for biomedical applications, First International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (Tours, 2009/3/15-19)

7) ○宇尾基弘・阿部薫明・赤坂 司・亘理文夫, シルクによる繊維強化レジンの作製とその機械的特性, 第51回日本歯科理工学会学術講演会(札幌, 2008年4月26,27日), 歯科材料・器械, 27(2), p.125, 2008

8)○宇尾基弘・朝倉清高, X線集光用ポリキャピラリーを用いた金属含有生物試料の微小部 XAFS 測定, 第11回 XAFS 討論会(姫路, 2008年9月6~8日)

9)○宇尾基弘・亘理文夫・猪野寿一, フレーク状ガラスフィラーを持ちいた高流動性歯科用コンポジットレジンの開発, 日本セラミックス協会 第21回秋季シンポジウム(北九州, 2008年9月17~19日), 同講演予稿集 p.18, 2008

10)○宇尾基弘・阿部薫明・赤坂 司・亘理文夫, ガラスフレークフィラーを用いた高流動性歯科用コンポジットレジンの開発, 第52回日本歯科理工学会学術講演会(大阪, 2008年9月20,21日), 歯科材料・器械, 27(5), 2008

11)○宇尾基弘・亘理文夫・浅岡憲三・朝倉清高, Ni-Ti 合金水素脆化時の腐食生成物の XANES 分析,

放射光／表面電子顕微鏡とナノ精密材料化学シンポジウム — 第4回放射光表面科学部会シンポジウム（札幌，2008年12月24,25日），同講演予稿集 p.24, 2008

12) 宇尾基弘・朝倉清高，ポリキャピラリを用いた金属含有生物試料の微小部 XANES 測定，第22回日本放射光学会年会（東京，2009年1月9～12日）

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

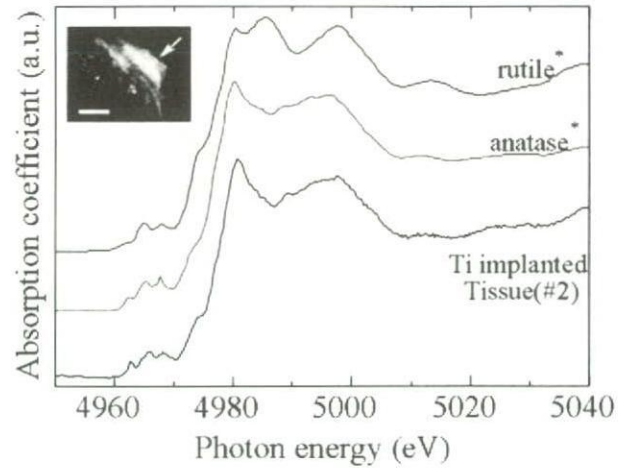
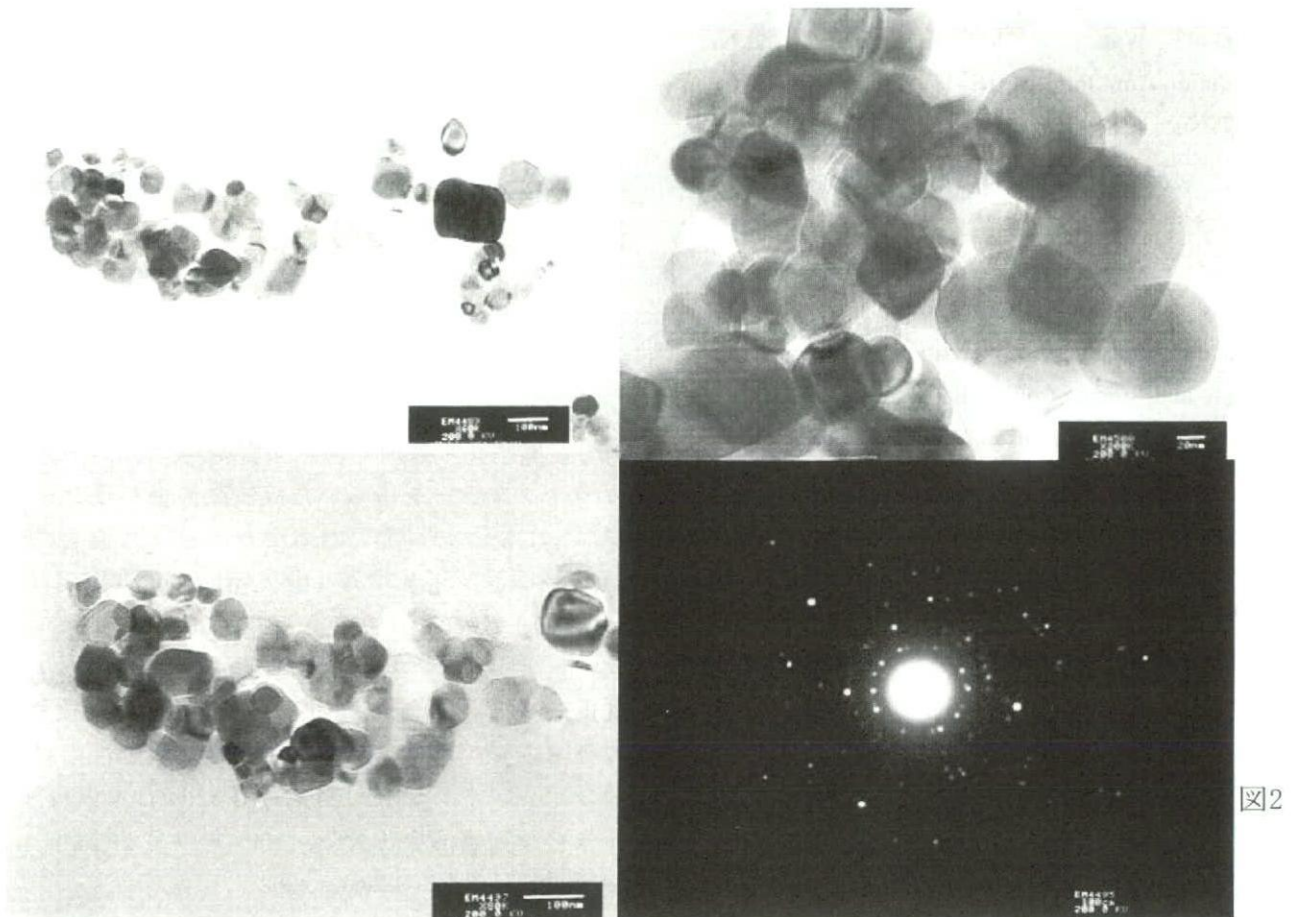


図1 Ti含有組織のTi K-edge XANESスペクトル



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

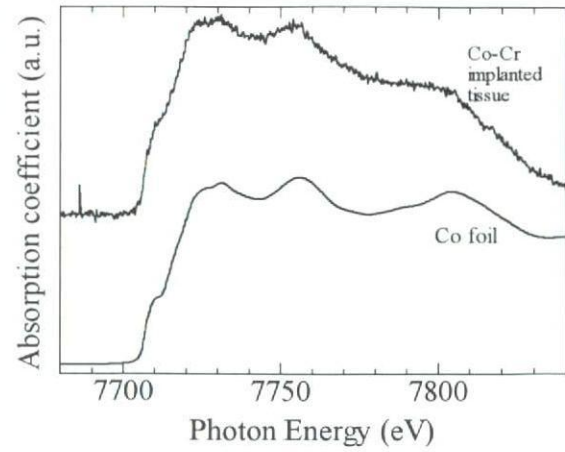
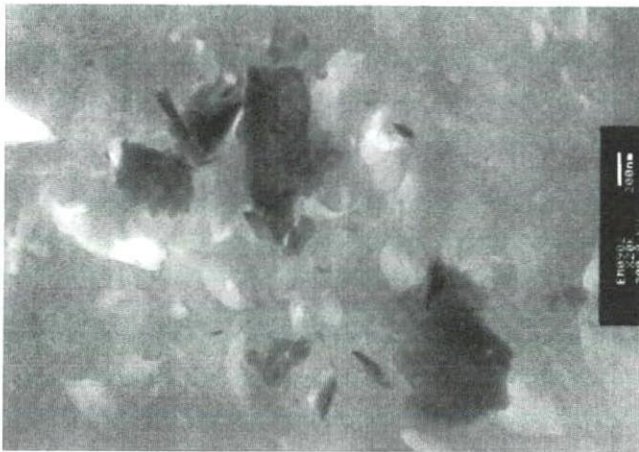


図3 試料A中の金属微粒子のTEM像とCo K-edge XANESスペクトル

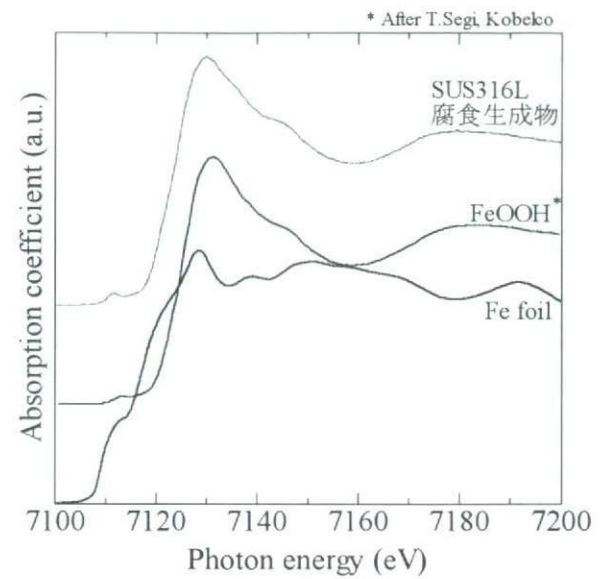
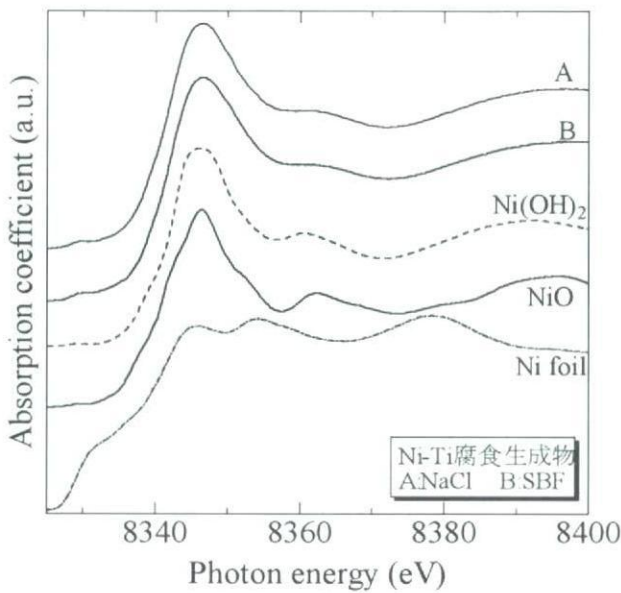


図4 水素チャージ後の生成微粒子のNi及びFe K-edge XANESスペクトル
(左: Ni-Ti合金, 右: SUS316L)

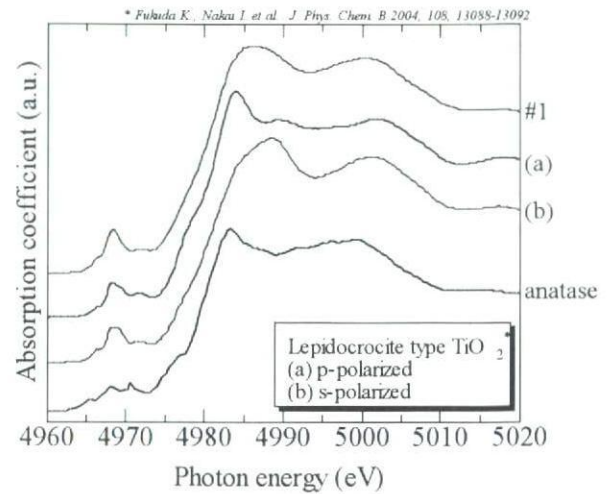
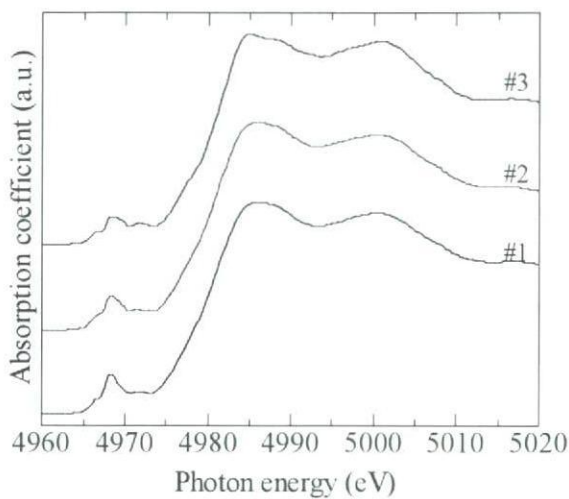


図5 試料#1~3のTi K-edge XANESスペクトル(左) とアナターゼ、レピドクロサイト型TiO₂のスペクトルとの比較(右)

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 北海道大学歯学研究科教授
研究協力者 水野峰男 (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)
橋本雅美 (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

人工股関節の摩耗特性は、現在ライナーと骨頭を潤滑液中に浸漬し、股関節シミュレーターにより評価される。潤滑液は、国際規格 ISO で牛血清を用いることが推奨されている。これは、牛血清を用いた場合に発生する摩耗粉の形状等が、臨床で患者に埋入した際に人工股関節から発生したものと類似しているためである。しかし、牛血清中のタンパク質量はメーカーやロットにより大きく異なるために、摩耗に影響するタンパク質量は一定である必要があり、多くの研究者の論議の対象となっている。また、摩耗特性のメカニズムを解明する際に用いる潤滑液としても、潤滑液中の成分による摩耗特性の違いを把握することは重要である。

そこで本研究では、ポリエチレン(PE)ライナーと酸化ジルコニウム(ZrO_2)骨頭の摩耗試験を種々の潤滑液中で実施し、その過程で発生する摩耗量および摩耗粉の評価解析を行った。潤滑液には 5 種類の液(平衡塩溶液(BSS)、牛血清アルブミンおよびグロブリンを溶解した平衡塩溶液(A+G+BSS)、A+G+BSS の 1.5 倍濃度溶液(1.5(A+G)+BSS)、Sigma 製牛血清溶液(CS1)および Biowest 製牛血清溶液(CS2)を使用した。まず潤滑液に平衡塩溶液(BSS)を用いた場合には、ライナーおよび骨頭ともほとんど摩耗しないことがわかった。これは、BSS が摩耗の原因であるタンパク質を全く含まない溶液であるためであると考えられる。次に BSS にアルブミンおよびグロブリンを溶解した A+G+BSS および 1.5(A+G)+BSS を用いた場合には、ライナーおよび骨頭とも摩耗した。特にライナーの摩耗率は、-12 および 17 mg/百万回であり、タンパク質量の増加とともに摩耗量も増加することがわかった。タンパク質は、骨頭とライナーの界面に侵入し、ライナーおよび骨頭に凝着することが報告されている。凝着したタンパク質量が微量の場合には、摩耗に対する保護膜としてタンパク質は働くが、量が多くなると凝着摩耗を引き起こす。今回用いた A+G+BSS および 1.5(A+G)+BSS とも凝着摩耗が生じていると考えられる。さらに、牛血清(CS1 および CS2)を用いた場合には、ライナーの摩耗率はそれぞれ 42 および 13 mg/百万回であった。今回実験に用いた潤滑液のタンパク質量は BSS < A+G+BSS < CS2 < 1.5(A+G)+BSS < CS1 の順に多くなるため、ライナーの摩耗量は潤滑液中の成分に関わらず、タンパク質量の増加に伴い大きくなることがわかった。

摩耗粉の形状に関しては、潤滑液に 1.5(A+G)+BSS を用いた場合のみ、ほとんどが繊維状でアスペクト比が大きかったのに対し、他の溶液の場合は粒状と繊維状のものが混在していた。粒径分布に関しては、何れの潤滑液の場合も、1 μm 以上の摩耗粉が殆どであった。

本研究の結果により、摩耗量に関しては潤滑液中のタンパク質量との間に相関があるが、摩耗粉の形状に関しては相関が無く、牛血清中で発生する摩耗粉と同形状のものをアルブミンとグロブリンを含む潤滑液中で発生させることは不可能であることがわかった。

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(M Φ)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。また、摩耗特性のメカニズムを解明する際に用いる潤滑液としても、潤滑液中の成分による摩耗特性の違いを把握することは重要である。

そこで本研究では、ポリエチレンライナーと酸化ジルコニウム骨頭の摩耗試験を種々の潤滑液中で実施し、その過程で発生する摩耗量および摩耗粉の評価解析を行うことを目的とした。

A. 研究方法

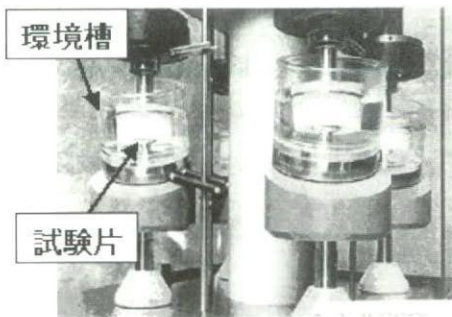
摩耗試験は、図1に示す MTS 社製のヒップシミュレータ (Multi- Station Hip Simulator) を用いて行った。

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 (NaN_3) 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3種類の液(表1)(平衡塩溶液(BSS)、牛血清アルブミンおよびグロブリンを溶解した平衡塩溶液(A+G+BSS)および A+G+BSS の 1.5 倍濃度溶液(1.5(A+G)+BSS)を使用し、液量約 750 ml で、毎秒1回の歩行周期(1 Hz)に 1.8 と 2.7 kN 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。

試験部材のライナーには、市販の超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)を使用した。試験部材の骨頭には、直径 26 mm 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。

表1 摩耗試験に使用した潤滑液の成分量

Lubricant (mg/ml)	(mg / ml)						
	NaCl	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	Protein (Total)	Albumin	Globulin		
					α-G	β-G	γ-G
BSS	8	3.58	0	0	0	0	0
A+G+BSS	8	3.58	10.7	7.3	0	0	3.4
1.5(A+G)+BSS	8	3.58	16.2	11.1	0	0	5.1
CS1	*1		18.3	8.4	2.7	3.4	3.8
CS2	*2		15.5	7.8	2.3	4.0	1.4

*1 Na 3.38 mg/ml, *2 Na 3.24 mg/ml

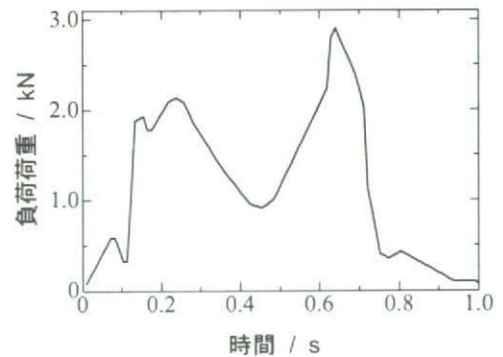


図2 荷重波形

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 750 ml から 10 ml 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 μm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。

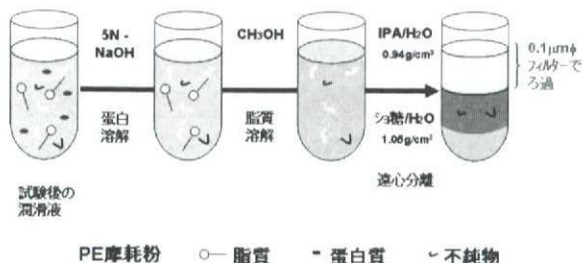


図3 摩耗粉の抽出方法

B. 研究結果

図4に試験回数にともなうUHMWPEライナーの重量変化を示す。まず潤滑液に平衡塩溶液(BSS)を用いた場合には、ライナーおよび骨頭ともほとんど摩耗しないことがわかった。これは、BSSが摩耗の原因であるタンパク質を全く含まない溶液であるためであると考えられる。次にBSSにアルブミンおよびグロブリンを溶解したA+G+BSSおよび1.5(A+G)+BSSを用いた場合には、ライナーおよび骨頭とも摩耗した。特にライナーの摩耗率は、-12および-17 mg/百万回であり、タンパク質量の増加にともない摩耗量も増加することがわかった。タンパク質は、骨頭とライナーの界面に侵入し、ライナーおよび骨頭に凝着することが報告されている。凝着したタンパク質量が微量の場合には、摩耗に対する保護膜としてタンパク質は働くが、量が多くなると凝着摩耗を引き起こす。今回用いたA+G+BSSおよび1.5(A+G)+BSSとも凝着摩耗が生じていると考えられる。さらに、牛血清(CS1およびCS2)を用いた場合には、ライナーの摩耗率はそれぞれ-42および-13 mg/百万回であった。今回実験に用いた潤滑液のタンパク質量は BSS < A+G+BSS < CS2 < 1.5(A+G)+BSS < CS1 の順に多くなるため、ライナーの摩耗量は潤滑液中の成分に関わらず、タンパク質量の増加に伴い大きくなることがわかった。

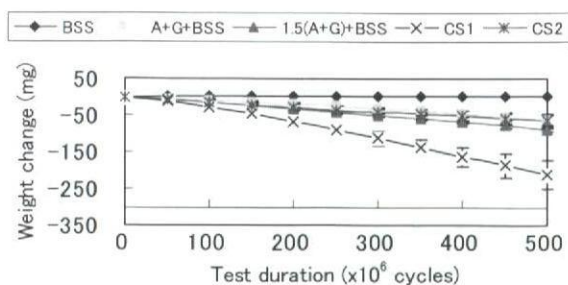


図4 潤滑液におけるUHMWPEライナーの重量変化量の重量変化量

次にヒップシミュレータによるZrO₂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5-1~5-5に示す。

試験を500万回行ったBSS中でUHMWPEライナーから発生した摩耗粉の場合、摩耗粉はほとんど観察されなかった(図5-1)。一方、A+G+BSS中でUHMWPEライナーから発生した摩耗粉の場合、顆粒状とフィブリル状のものが混在していたが、顆粒状の摩耗粉に比べてフィブリル状の摩耗粉の方が多く観察された(図5-2)。さらに、1.5(A+G)+BSS中でUHMWPEライナーから発生した摩耗粉の場合、ほとんどが繊維状のものであることがわかった(図5-3)。さらに、血清中で発生した摩耗粉に関しては、CS1の場合、繊維状とフィブリル状のものが混在しているのに対し、CS2の場合、粒状もしくはフィブリル状のものが多かった。

表2に種々の潤滑液中で発生した摩耗粉の数および面積を示す。BSS中で発生したUHMWPE摩耗粉の個数および面積は、それぞれ10個および0.2 µm²であった。潤滑液中のタンパク質量が増加すると摩耗粉個数および面積は増加し、具体的にはA+G+BSS中では171個および20.6 µm²であり、1.5(A+G)+BSS中では1782個および339.9 µm²であった。CS1とCS2の場合、個数および面積はそれぞれ、3621個および1756 µm²と1191個および434.3 µm²であった。これらの結果は、図4の摩耗特性および図5のSEM写真の結果と一致していた。