

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案  
分担研究課題名：ナノマテリアルの特性評価

分担研究者：林 幸彦 九州大学大学院歯学研究院 准教授

**研究要旨：**鉄（III）アセチルアセトネートを前駆体として用いた加水分解・縮合により、結晶子サイズ及び磁氣的性質が精密に制御された酸化鉄ナノ粒子（マグネタイト或いはマグヘマイト）を得ることに成功した。得られた酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズは加水分解・縮合に用いるヒドラジン-水和物と水の添加量で制御することができた。結晶子サイズは5～10 nmの範囲で、ナノメートルレベルで制御でき、これに伴い磁気特性も変化した。室温において、最小結晶サイズの酸化鉄ナノ粒子の飽和磁化は約 50 emu/g であり、最大結晶子サイズの酸化鉄ナノ粒子の飽和磁化は 80 emu/g であった。つまり、結晶サイズが約 5 nm 増加すると、飽和磁化が約 1.6 倍増加することが明らかになった。また、最大結晶子サイズの酸化鉄ナノ粒子の飽和磁化は、バルクのマグネタイトの 85%以上の飽和磁化を示し、比表面積の大きいナノ粒子にしては高い飽和磁化を示した。一方、結晶子サイズによらず全ての酸化鉄ナノ粒子において、保磁力及び残留磁化がゼロであり、超常磁性的挙動を示した。以上より、本手法を用いることで、結晶子サイズと磁気特性を制御でき、その磁気特性は超常磁性であり、高い飽和磁化を示すことが明らかになった。研究班内で共通に使用する 5 種類の二酸化チタンナノ粒子の粒度分布を蒸留水および細胞培養培地中で測定した。二酸化チタンナノ粒子は種類および分散濃度によらず蒸留水および細胞培地中で凝集していた。各酸化チタンナノ粒子の一次粒径は数ナノメートルから数十ナノメートルであるが、溶液中ではサブミクロンから数十マイクロメートルの凝集体として存在していることが明らかになった。以上より、バイオメディカル応用に資する酸化鉄ナノ粒子の合成法の樹立及び毒性評価を含む医学生物研究における二酸化チタンの取り扱いに注意すべきことを明らかにした。

## A. 研究目的

細胞・タンパクの分離、磁気共鳴画像法 (MRI)、磁気ハイパーサーミア等のバイオメディカル分野において、酸化鉄ナノ粒子が用いられている。これらの用途では、超常磁性を示す酸化鉄ナノ粒子を用いることが多い。酸化鉄ナノ粒子の場合、超常磁性は一般に10 nm以下で発現される。一方、10 nm以下の酸化鉄ナノ粒子では目的とする性能が得られないことがある。例えば、酸化鉄ナノ粒子を磁気ハイパーサーミアに応用する場合、発熱能が不足しており、適正濃度において、治療効果を示す温度まで加熱することができないことがある。このため、10 nm以下の超常磁性を維持しつつ、磁気特性、特に飽和磁化を高めることが求められる。そこで本研究では、10 nm以下の範囲において、酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズを精密に制御する方法を確立し、超常磁性を示しつつ、飽和磁化を可能な限り高めることを試みた。

## B. 研究方法

### ①酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立(1)

Fe(acac)<sub>3</sub>のエタノール溶液を作製した。この溶液にヒドラジン-水和物および0.3%コラーゲン水溶液を添加し、80°Cで24時間攪拌した。各原料の濃度を表1に示す。

表 1. コラーゲン修飾酸化鉄ナノ粒子の合成条件

条件	溶媒	Fe <sup>3+</sup> 濃度 (mM)	ヒドラジン-水和物	0.3% コラーゲン水溶液
A	EtOH	0.45	6当量	72当量
B	EtOH	0.67	6当量	72当量
C	EtOH	0.9	6当量	72当量
D	EtOH	1.12	6当量	72当量

### ②酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立(2)

鉄（III）アセチルアセトネート (Fe(acac)<sub>3</sub>、日本化学産業、東京) をエタノールに溶解した。この溶液に、hydrazine monohydrateを（キシダ化学、大阪）と蒸留水を添加した。異なるFe(acac)<sub>3</sub>溶液濃度、hydrazine monohydrate添加量、蒸留水添加量で合成した酸化鉄ナノ粒子のサンプル名をMNPs-1～MNPs-9とし、表1にこれらの合成条件を示す。Fe(acac)<sub>3</sub>溶液にhydrazine monohydrateと蒸留水を添加した後、78°Cで24時間攪拌した。最後に、遠心分離（10,000 rpm、10分）により生成した酸化鉄ナノ粒子を回収し、エタノールと蒸留水で少なくとも3回洗浄した。

### ③二酸化チタンナノ粒子の蒸留水および細胞培

地中での粒度分布を測定(研究班内共通使用)

5種類のテイカ株式会社製酸化チタンナノ粒子を使用した: AMT100、AMT600、MT150、MT500、TKP102。これらの酸化チタンナノ粒子を15.63、31.25、62.5 µg/mLの濃度で蒸留水またはウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM+FBS)に分散させた。調製した懸濁液中の粒度分布およびゼータ電位をベックマンコールター製DelsaMax Proを用いて、動的光散乱法により求めた。懸濁液の調整条件(二酸化チタン、溶媒、濃度)を表3に示す。

表2. 酸化鉄ナノ粒子の合成条件

Sample	Fe(acac) <sub>3</sub> concentration (mM)	Additive amount of hydrazine monohydrate (equiv.)	Additive amount of distilled water (equiv.)
MNPs-1	0.5	6	72
MNPs-2	0.7	6	72
MNPs-3	0.9	4	72
MNPs-4	0.9	6	36
MNPs-5	0.9	6	72
MNPs-6	0.9	6	108
MNPs-7	0.9	8	72
MNPs-8	0.9	8	144
MNPs-9	1.1	6	72

表3. 粒度分布およびゼータ電位測定に用いた懸濁液

TiO <sub>2</sub> サンプル名	溶媒	濃度(µg/mL)
AMT100	蒸留水	15.6
AMT100	蒸留水	31.3
AMT100	蒸留水	62.5
AMT600	蒸留水	15.6
AMT600	蒸留水	31.3
AMT600	蒸留水	62.5
MT150	蒸留水	15.6
MT150	蒸留水	31.3
MT150	蒸留水	62.5
MT500	蒸留水	15.6
MT500	蒸留水	31.3
MT500	蒸留水	62.5
TKP102	蒸留水	15.6
TKP102	蒸留水	31.3
TKP102	蒸留水	62.5
AMT100	DMEM+FBS	15.6
AMT100	DMEM+FBS	31.3
AMT100	DMEM+FBS	62.5
AMT600	DMEM+FBS	15.6
AMT600	DMEM+FBS	31.3
AMT600	DMEM+FBS	62.5
MT150	DMEM+FBS	15.6
MT150	DMEM+FBS	31.3
MT150	DMEM+FBS	62.5
MT500	DMEM+FBS	15.6
MT500	DMEM+FBS	31.3
MT500	DMEM+FBS	62.5
TKP102	DMEM+FBS	15.6
TKP102	DMEM+FBS	31.3
TKP102	DMEM+FBS	62.5

### C. 研究結果

#### ①酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立(1)

条件A~Dにより得られたナノ粒子のTEM像と粒度分布、平均粒径を図1に示す。鉄源濃度が高くなるにつれて平均粒径も増加した。鉄源濃度の調整により、ナノメートルオーダーで粒径を制御することができた。

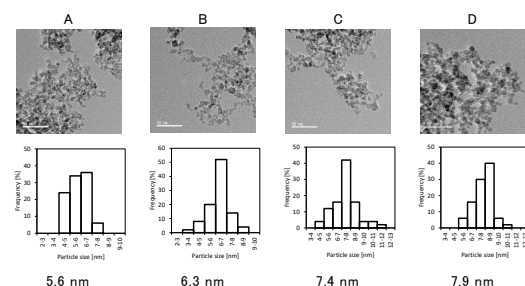


図1. 条件A~Dで作製した酸化鉄ナノ粒子のTEM(上)、粒度分布(中)、平均粒径(下)

図2に条件A~Dで作製した酸化鉄ナノ粒子のXRDパターンを示す。どの条件においてもマグネタイト単相であった。また、鉄源の濃度が増加するにつれて、結晶子サイズが増大しており、TEMから見積もった粒径と同じ挙動を示した。

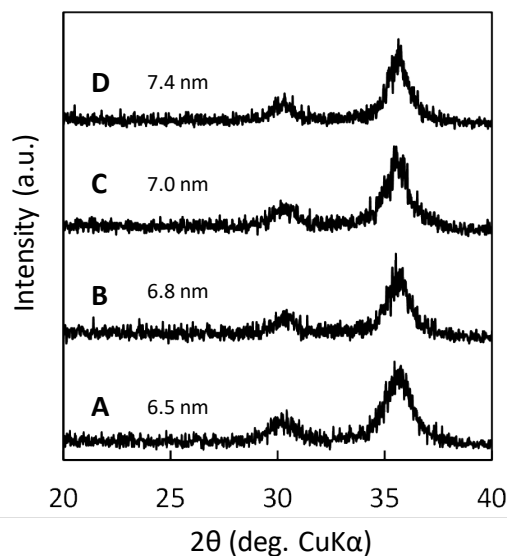


図2. XRDパターン

図3に条件A~Dで作製した酸化鉄ナノ粒子とコラーゲン非修飾酸化鉄ナノ粒子の熱重量(TG)曲線を示す。酸化鉄ナノ粒子の粒径が小さくなるにつれて重量減少が大きくなり、酸化鉄ナノ粒子の表面積が増加するにつれてコラーゲン被覆量が増加することが明らかになった。

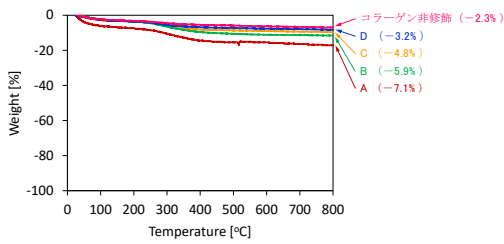


図 3. TG 曲線

最も粒径が大きかった条件 D で作製した酸化鉄ナノ粒子の磁気特性を図 4 に示す。室温では保磁力および残留磁化がゼロであったが (図左)、10 K では保磁力および残留磁化を有していた (図中)。また、ブロッキング温度は 245 K であった。以上より、この酸化鉄ナノ粒子は超常磁性を示すことが明らかになった。

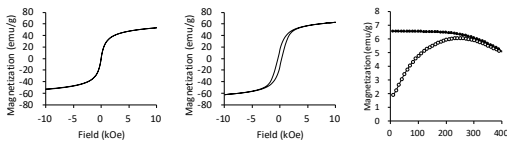


図 4. 条件 D で作製した酸化鉄ナノ粒子の磁気特性：室温での磁化曲線 (左)、10 K での磁化曲線 (中)、ZFC-FC 曲線 (右)

②酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立(2)

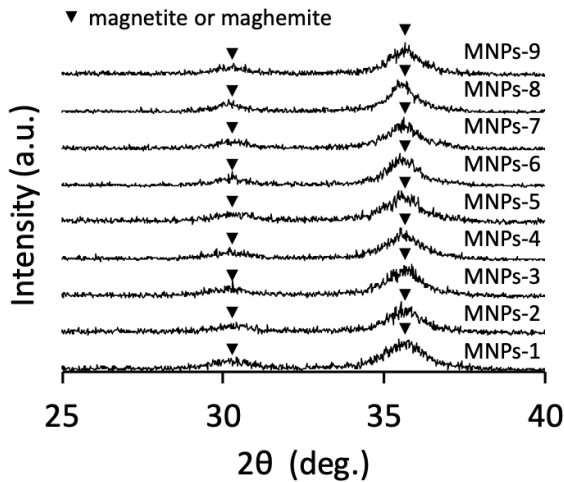


図5. 酸化鉄ナノ粒子のXRDパターン

図5に合成した酸化鉄ナノ粒子 (サンプル名 MNPs-1~MNPs-9) のX線回折 (XRD) 図形を示す。全てのサンプルにおいて、X線回折パターンはマグネタイト・マグヘタイトのパターンと一致した。これにより、本手法により、マグネタイト・マグヘタイトを合成できることが明らかになった。

Scherrer式から、MNPs-1~MNPs-9の結晶子サイズを求め、結晶子サイズに及ぼすFe(acac)<sub>3</sub>濃度の影響、ヒドラジン添加量の影響、水添加量の影響を評価した (図6)。

添加量、水添加量の増加とともに、結晶子サイズも増大した。これらの条件を調整することにより、酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズは5~10 nmの範囲で、ナノメートルレベルで制御できることが明らかになった。

MNPs-1~MNPs-9の室温での磁気特性を振動試料型磁力計により測定し、酸化鉄ナノ粒子合成時のFe(acac)<sub>3</sub>濃度、ヒドラジン添加量、水添加量 (つまり酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズ) が磁気特性に与える影響を評価した (図7)。

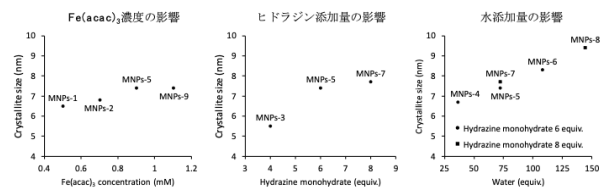


図 6. 酸化鉄ナノ粒子作製条件と結晶子サイズの関係

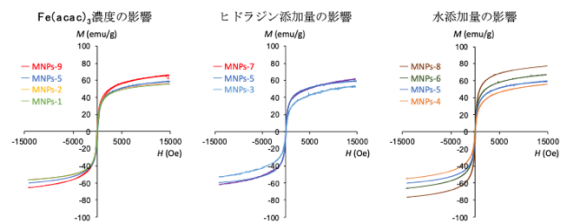


図 7. 酸化鉄ナノ粒子の室温での磁化曲線

表 4. 各懸濁液のゼータ電位

TiO <sub>2</sub> サンプル名	濃度 (μg/mL)	蒸留水のゼータ電位 (mV)	DMEM+FBS 中でのゼータ電位 (mV)
AMT100	15.6	-64.4	-4.9
AMT100	31.3	-75.9	-5.6
AMT100	62.5	-56.6	-6.4
AMT600	15.6	-24.9	-6.2
AMT600	31.3	-99.5	-4.6
AMT600	62.5	-89.6	-6.9
MT150	15.6	-45.3	-1.4
MT150	31.3	-77.6	-7.2
MT150	62.5	-68.4	-5.8
MT500	15.6	-30.3	-3.0
MT500	31.3	-32.0	-4.8
MT500	62.5	-22.8	-6.7
TKP102	15.6	-25.9	-2.3
TKP102	31.3	-26.1	-0.4
TKP102	62.5	-27.8	-3.1

③二酸化チタンナノ粒子の蒸留水および細胞培地中での粒度分布を測定 (研究班内共通使用) 懸濁液の蒸留水中での粒度分布を図 8 に示す。AMT100、AMT600、MT150 は 100~200 nm と 200 nm~3μm の凝集体を形成していた。粒子濃度が高くなるにつれて、若干、粒径が増加していた。MT500 は粒子濃度によらず、100~1000 nm

の凝集体を形成した。TKP102は粒子濃度による粒度分布の違いはほとんどなく、100~200 nm、200 nm~3 $\mu$ m、3~20 $\mu$ mの凝集体を形成していた。つまり、いずれの二酸化チタンナノ粒子も一次粒子としては存在しておらず、凝集していることが明らかになった。各懸濁液のDMEM+FBS中での粒度分布を図2に示す。AMT100は濃度によらず200 nm以下と200 nm~20 $\mu$ mの2種類の凝集体として存在していた。AMT600も濃度によらず200 nm以下と200 nm~10 $\mu$ mの2種類の凝集体として存在していた。MT150は、40 nm以下、40~400 nm、400 nm~5 $\mu$ mの3種類の凝集体として存在していた。MT500は、100 nm以下と100~1000 nmの2種類の凝集体を形成していた。TKP102は粒子濃度により粒度分布が異なり、粒子濃度が高くなるにつれて、粒径が増大していた。以上の結果から、蒸留水中と同様に、DMEM+FBS中でもこれらの二酸化チタンナノ粒子は凝集体として存在していることが明らかになった。

表2に各懸濁液のゼータ電位を示す。いずれの二酸化チタンも負電荷を帯びており、蒸留水中の方が絶対値が大きくなった。MT500およびTKP102はその他の二酸化チタンに比べゼータ電位の絶対値が小さい傾向があった。

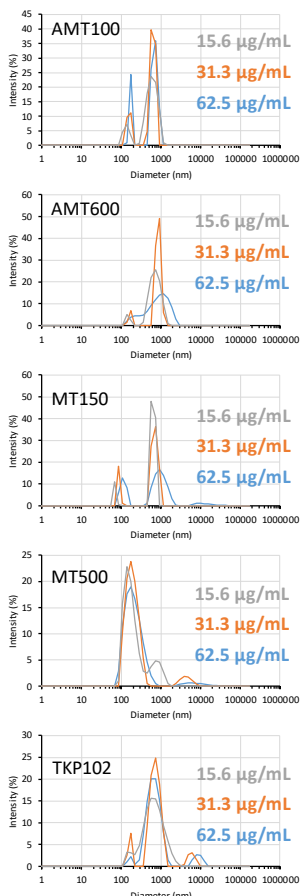


図8. 各懸濁液の蒸留水中での粒度分布

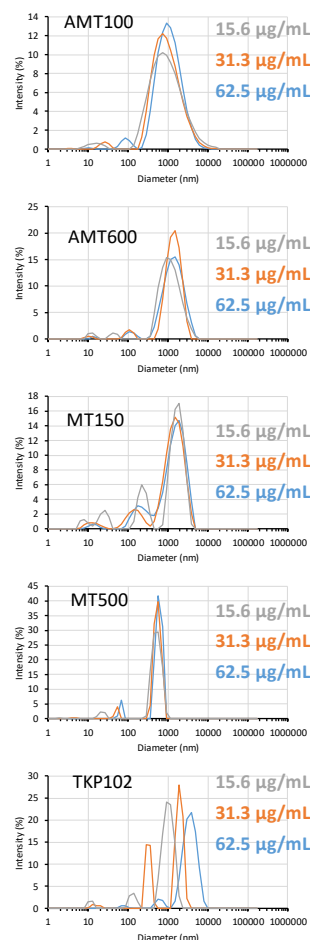


図9. 各懸濁液のDMEM+FBS中での粒度分布

#### D. 考察

①酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立(1)：本方法は、 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ は空气中で安定であるため、加水分解を受けにくく、空气中で取り扱うことが容易である利点から、同じ特性を有する酸化鉄ナノ粒子を安定的に作製することが可能であった。また、添加剤の濃度により、加水分解-縮合速度を制御することができ、粒径をシングルナノメートルオーダーで制御することができた。

②酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立(2)：鉄錯体を前駆体とする加水分解・縮合により酸化鉄ナノ粒子を合成する本方法は、 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 濃度、ヒドラジン添加量、水添加量の調整により、1ナノメートルオーダーで結晶子サイズを制御でき、従前の酸化鉄作製法に比べより精密な結晶子サイズ制御が可能である。本方法(2)により、いずれのサンプルも超常磁性的挙動を示すが、その飽和磁化は結晶子サイズに大きく依存することを認めた。加えて、本手法で得られる酸化鉄ナノ粒子の粒子径に占める磁氣的粒径が大きいことを認めた。バイオメディカル用途において用いられる酸化鉄ナノ粒子は超常磁性を示すものが多いが、用途によっては飽和磁化が不足しており、満足のいく結果が得られ

ないことがある。本研究は、超常磁性を示す範囲で、最大限飽和磁化を高める手法を提案するものであり、バイオメディカル応用に資する酸化鉄ナノ粒子の合成に役立つと思われる。

③二酸化チタンナノ粒子の蒸留水および細胞培地中での粒度分布を測定(研究班内共通使用)：いずれの二酸化チタンナノ粒子も溶液中では凝集しており、実際の二酸化チタンを使用する際に、一次粒子として存在する二酸化チタンナノ粒子に暴露されることは少ないと考えられる。これは酸化チタンナノ粒子に限らず、他組成のナノ粒子にも言えることである。ナノ粒子の毒性を評価するにあたり、二次粒子の毒性を評価している可能性があることを考慮に入れる必要があると考えられた。

## E. 結論

① $\text{Fe}(\text{acac})_3$ を前駆体として、加水分解・縮合により、酸化鉄ナノ粒子を作製において、前駆体濃度及び加水分解・縮合条件によって、酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズをナノメートルスケールで制御することができ、これにより磁気特性も制御することができた。

②二酸化チタンナノ粒子の生体への影響を解析する場合、凝集体として存在しやすいことより注意が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. [Hayashi K](#), Kato N, Kato M, Ishikawa K. Impacts of channel direction on bone tissue engineering in 3D-printed carbonate apatite scaffolds. *Mater Des*, 2021 DOI: 10.1016/j.matdes. 2021.109686.
2. Sakemi Y, [Hayashi K](#), Akira Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K. Reconstruction of critical-size segmental defects in rat femurs using carbonate apatite honeycomb scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 2021. DOI: 10.1002/jbm.a.37157.
3. [Hayashi K](#), Ishikawa K. Honeycomb scaffolds fabricated using extrusion molding and sphere packing theory for bone regeneration. *ACS Appl Bio Mater*, 4(1), 721-730, 2021.
4. Kim H, Röth D, Isoe Y, [Hayashi K](#), Mochizuki C, Markus K, Nakamura M. Protein corona components of polyethylene glycol-conjugated organosilica nanoparticles modulates macrophage uptake. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 199, 111527, 2021.
5. [Hayashi K](#), Ishikawa K. Effects of nanopores on the mechanical strength, osteoclastogenesis, and osteogenesis in honeycomb scaffolds. *J Mater Chem B*, 8(37), 8536-8545, 2020.
6. Nakamura M, [Hayashi K](#), Nakamura J, Mochizuki C, Murakami T, Miki H, Ozaki S, Abe M. Near-infrared fluorescent thiol-organosilica

nanoparticles that are functionalized with IR-820 and their applications for long-term imaging of in situ labeled cells and depth-dependent tumor in vivo imaging. *Chem Mater* 32(17), 7201-7214, 2020.

7. Putri TS, [Hayashi K](#), Ishikawa K. Fabrication of three-dimensional interconnected porous blocks composed of robust carbonate apatite frameworks. *Ceram Int*, 46(12), 20045-20049, 2020.
8. [Hayashi K](#), Tokuda A, Nakamura J, Sugawara-Narutaki A, Ohtsuki C. Tearable and fillable composite sponges capable of heat generation and drug release in response to alternating magnetic field. *Mater*, 13(16), 3637, 2020.
9. Swe TT, Shariff KA, Mohamad H, Ishikawa K, [Hayashi K](#), Bakar MHA. Behavioural response of cells and bacteria on single and multiple doped Sr and Ag S53P4 sol-gel bioglass. *Ceram Int*, 46(11), 17881-17890 2020.
10. [Hayashi K](#), Munar ML, Ishikawa K. Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl*, 111, 110848, 2020.
11. [Hayashi K](#), Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Granular Honeycombs Composed of Carbonate Apatite, Hydroxyapatite, and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate as Bone Graft Substitutes: Effects of Composition on Bone Formation and Maturation. *ACS Appl Bio Mater*, 3, 1787-1795, 2020
12. Putri TS, [Hayashi K](#), Ishikawa K. Bone regeneration using  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) block with interconnected pores made by setting reaction of  $\beta$ -TCP granules, *J Biomed Mater Res A*, 108A, 625-632, 2020.
13. 林幸彦朗, “骨髄様組織を形成するハニカムスキャフォールド” *BIO INDUSTRY*, シーエムシー出版, 2月号, 24-33, 2020.
14. [Hayashi K](#), Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Carbonate Apatite Micro-Honeycombed Blocks Generate Bone Marrow-Like Tissues as well as Bone. *Adv Biosys*, 3, 1900140, 2019.
15. [Hayashi K](#), Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Honeycomb blocks composed of carbonate apatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite for bone regeneration: effects of composition on biological responses, *Mater Today Bio*, 4, 100031, 2019.
16. [Hayashi K](#), Munar ML, Ishikawa K. Carbonate apatite granules with uniformly sized pores that arrange regularly and penetrate straight through granules in one direction for bone regeneration. *Ceram Int*, 45, 15429-15434. 2019.
17. Shi R, [Hayashi K](#), Bang LT, Ishikawa K. Effects of surface roughening and calcite coating of titanium on cell growth and differentiation. *J Biomater Appl*, 34, 917-927, 2019.

18. Ishikawa K, Arifita T, Hayashi K, Tsuru K. Fabrication and Evaluation of Interconnected Porous Carbonate Apatite from Alpha Tricalcium Phosphate Spheres. J Biomed Mater Res B, 107, 269-277, 2019.
19. Sakemi Y, Hayashi K, Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K. Fabrication and Histological Evaluation of Porous Carbonate Apatite Block from Gypsum Block Containing Spherical Phenol Resin as a Porogen. Mater, 2019, 12, 3997, 2019.
20. K.Hayashi, A.Tokuda, W.Sakamoto. Hydroxyl Radical-Suppressing Mechanism and Efficiency of Melanin-Mimetic Nanoparticles. Int J Mol Sci, 19, 2309, 2018.
21. K.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, E.Usugi, M.Watanabe, T.Yogo. Red Blood Cell-Shaped Microparticles with a Red Blood Cell Membrane Demonstrate Prolonged Circulation Time in Blood. ACS Biomater Sci Eng, 4, 2729, 2018.
22. K.Hayashi, H.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, T.Yogo. Cellulose-based molecularly imprinted red-blood-cell-like microparticles for the selective capture of cortisol. Carbohydr Polym, 193, 173, 2018.

## 2. 学会発表

1. 林幸壺朗、石川邦夫. 「炭酸アパタイトハニカムスキャホールドの骨誘導能評価」、日本歯科理工学会 第75回学術講演会
2. Hayashi K. Impacts of pore architecture on bone regeneration in honeycomb scaffolds, KOB & OBT Research Center Joint International Symposium, Feb. 6, 2021, Fukuoka. 受賞講演

## G.知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

1. 発明の名称：医用ハニカム構造体およびその製造方法、医用組織再建袋、成形型. 発明者：石川 邦夫、林 幸壺朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴. 出願人：石川邦夫、株式会社ジーシー. 国際出願番号：PCT/JP2021/008783 出願日：2021.3.5.
2. 発明の名称：医用ハニカム構造体およびその製造方法、医用組織再建袋、成形型. 発明者：石川 邦夫、林 幸壺朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴. 出願人：石川邦夫. 出願番号：特願2021-034784. 出願日：2021.3.4.
3. 発明の名称：炭酸アパタイト被覆材料およびその製造方法. 発明者：石川 邦夫、林 幸壺朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴. 出願人：石川邦夫. 出願番号：特願2021-56520. 出願日：2021.3.30.

4. 発明の名称：医用ハニカム構造体、成形型、および製造方法. 発明者：石川 邦夫、林 幸壺朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴. 出願番号：特願 2020-38167. 出願日：2020.3.5.
5. 発明の名称：炭酸アパタイト被覆材料およびその製造方法. 発明者：石川 邦夫、林 幸壺朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴. 出願番号：特願 2020-063503. 出願日：2020.3.31.

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

1. 2020年度 九州大学歯学優秀研究者賞, 九州大学, 2021年1月.
2. 日本歯科理工学会 第75回学術講演会 株式会社ジーシー賞受賞, 2020年4月.