



図6 ナノラボ社製の未精製カーボン
ナノチューブ



図7 ナノラボ社製の未精製カーボン
ナノチューブ

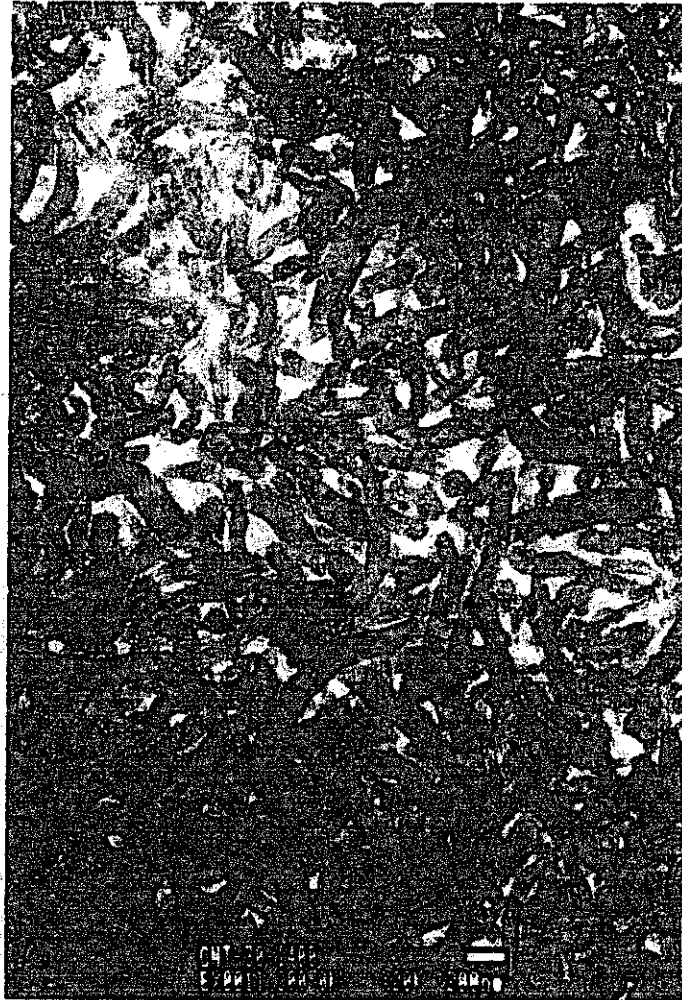


図8島津製作所製の 1400°C 固化カーボンナノチューブ



図9 島津製作所製の 2000°C 固化カーボンナノチューブ



図 10 島津製作所製の 2000°C 固化
カーボンナノチューブ



図 11 島津製作所製の 2000°C 固化
カーボンナノチューブ

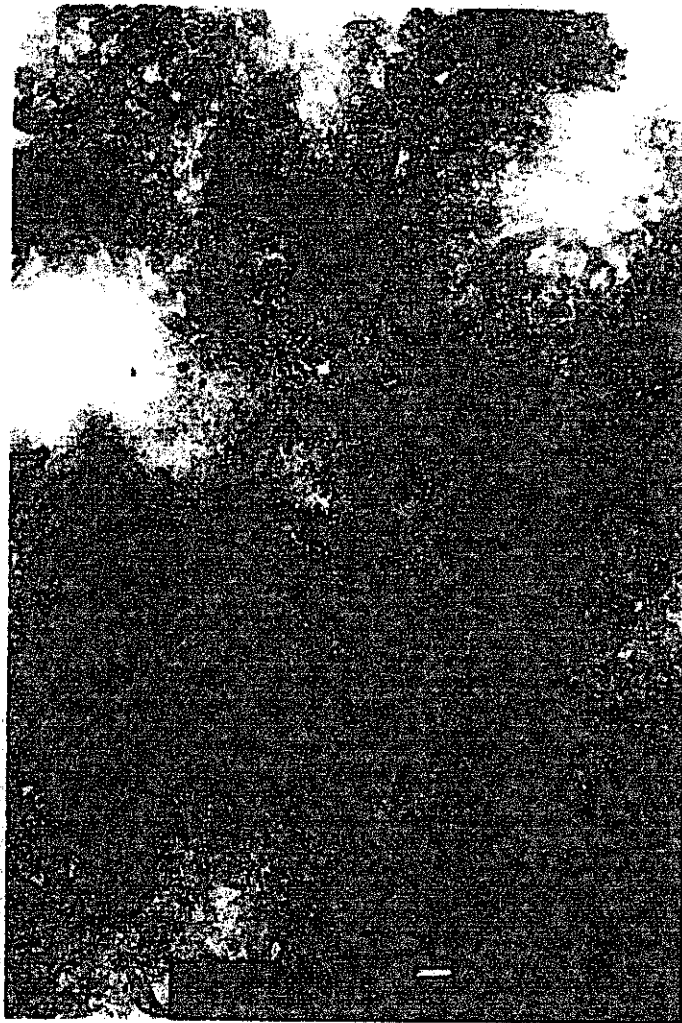


図 12 アルバック社製の 1000°C 固化カーボンナノチューブ

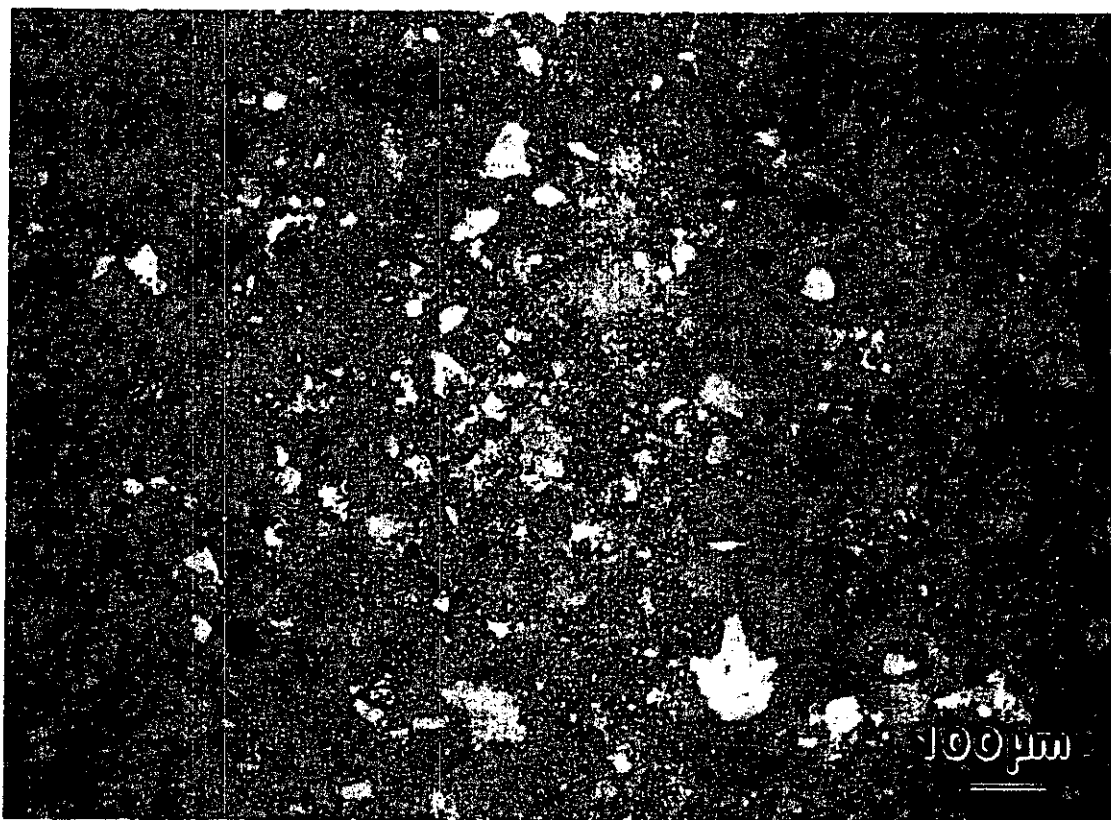


図 13 ナノラボ社製の 1400°C 固化カーボンナノチューブの光学顕微鏡写真

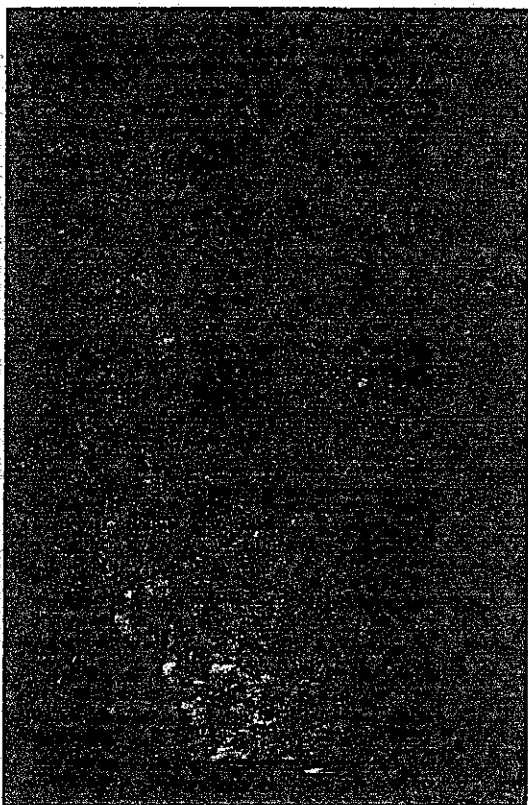


図 14 ナノラボ社製の 1000°C 固化
カーボンナノチューブ



図 15 ナノラボ社製の 1000°C 固化
カーボンナノチューブ

分担研究報告書

カーボンナノチューブ（CNT）固化体の特性評価ならびに
CNTとTiのHApコーティングに関する研究

橋田 俊之・高橋 亨・小野木 伯薫

東北大学大学院工学研究科 附属破壊制御システム研究施設

研究要旨：本研究においては、カーボンナノチューブ（CNT）固化体の機械的特性評価を目的とし、放電プラズマ焼結（SPS）法により作製したCNT固化体のスモールパンチ（SP）試験による破壊評価を行った。その結果、SP試験法によりCNT固化体の破壊強度、破壊エネルギー等の機械的特性を評価することが可能となり、焼結時の温度・圧力条件等によって強度の向上および準脆性的な挙動を示すことが明らかとなり、これらの条件についてさらに検討を進めることにより、生体材料として利用可能なCNT固化体を得られることを示唆する結果が得られた。

-カーボンナノチューブ固化体の特性評価-

A. 研究目的

カーボンナノチューブをバイオマテリアルとして利用するためには、ナノチューブの生体適合性の評価とともに、生体材料としてのナノチューブバルク体の作製法の確立が不可欠である。ナノチューブ単体においては軽量かつ高強度であり、その機械的特性は生体材料として最適なものであるが、カーボンナノチューブを固化体として成形・機械的評価を行った事例はほとんどなく、固化体としたときの機械的特性については未知の検討課題となっている。本課題においては、放電プラズマ焼結法（Spark Plasma Sintering, SPS法）により作製されたカーボンナノチューブ焼結固化体の機械的特性評価を行い、生体材料としてのナノチューブ固化体の最適作製条件について検討を行う。

B. 研究方法

ナノチューブの固化には放電プラズマ焼結法（SPS法）を用いた。今回の実験に用いた固化体の作製条件を、Table.1に示す。同じ出発原料を用いて温度・圧力条件等を変化させた試験片を作製し、実験に供した。

カーボンナノチューブ固化体の力学的特性評価には、スモールパンチ（SP）試験法による破壊特性評価を行った。SP試験装置の該略図をFig.1に示す。SP試験法を用いることにより、高価なCNTの実験においても小さな試験片を用いた材料評価が可能であり、また、破壊過程においては2軸引張応力状態となるため、CNT固化体の破壊強度および破壊エネルギーを同時に測定することが可能となる。

本実験においては、SPS法により作成された直径10mm、厚さ約1mmの小型円盤状試験片を用いる。試験片中央に小型パンチャーを押し付けることにより、試験片に負荷される荷重と、

試験片下部に設置した変位計により荷重線変位を求め、得られた荷重-荷重線変位より破壊挙動を評価する。試験時のパンチャーの移動速度は0.05mm/minとした。また試験治具の側面にアコースティックエミッション (AE) センサーを取り付け、固化体の破壊時に発生する AE も同時に測定を行った。

C. 研究結果

実験により得られた荷重-荷重線変位図の例を Fig.2 に示す。Fig.2 においては負荷の初期段階においてはいずれも弾性変形を示しているが、CNT-30-1000-80 の試験片においては荷重は最大値に達した後に急激に降下し、試験片が脆性破壊したことを示している。一方で、CNT-50-1000-80 の試験片においては、最大荷重に達した後に一度荷重は低下するが、その後再び増加に転じ、徐々に荷重が低下する準脆性的な挙動を示した。時間変化と発生した AE の振幅値を Fig.3 に示す。Fig.3(a) は CNT-30-1000-80、Fig.3(b) は CNT-50-1000-80 の測定結果である。CNT-30-1000-80 の試験片においては、AE はほとんど発生していない。対して、CNT-50-1000-80 の試験片においては、破壊の進行に伴い連続的に非常に多くの AE 信号が発生する様子が観察された。これは破壊が進行するにつれて、き裂面において繊維状のナノチューブが引き抜かれるような状態になることにより、強度を保持しているため、最大荷重後も急激に荷重が降下することなく、準脆性的な挙動を示すものと考えることができる。

荷重-荷重線変位曲線より求めた最大荷重と弾性率、破壊エネルギーの関係を示した図を Fig.4 に示す。Fig.4(a)は破壊強度と弾性率、Fig.4(b)は破壊強度と破壊エネルギーの関係を示した図である。図中には今回実験を行った全ての試験片についての結果を示してあるが、強度、弾性率の高い試験片においては脆性破壊し、破壊エネルギーはあまり大きな値が得られず、一

方、破壊エネルギーの高い準脆性的な破壊を示した試験片においては破壊強度が低くなる傾向が観察された。

D. 考察

今回の実験結果から、温度・圧力条件等を変化させることにより脆性破壊する試験片と準脆性的な挙動を示す試験片を得ることができた。高温で焼結した試験片は脆性的な挙動を示し、また添加剤の量の多い試験片ほど準脆性的な挙動を示すことが明らかとなった。これは、材料中に存在する空隙の影響によるものと考えることができ、高温で焼結するとより緻密になり、また添加剤の量が多いほど焼結時に添加剤が消失し、空孔が増加するものと推察される。しかしながら空孔が多いことにより強度の低下が生じており、高強度・高靱性の固化体の最適条件は明らかにできなかった。また、固化体作成時の CNT の純度も破壊特性に影響を及ぼすことも予備実験により示されており、今後は固化体生成時の温度・圧力・ナノチューブの純度やナノチューブの配向性に関する検討を行うことにより、さらに靱性値の高い材料生成法について検討する。

E. 結果

CNT 固化体の機械的特性評価を目的とし、SPS 法により作製した CNT 固化体を SP 試験法を用いて破壊試験を行った。その結果、焼結時の温度・圧力条件等により強度の向上および準脆性的な破壊挙動を示す試験片を得ることが可能であることがわかった。今後は、生体材料として利用できる強度特性を持った試験片を得ることを目標とし、CNT の純度や焼結条件の最適化に関して検討を行う。

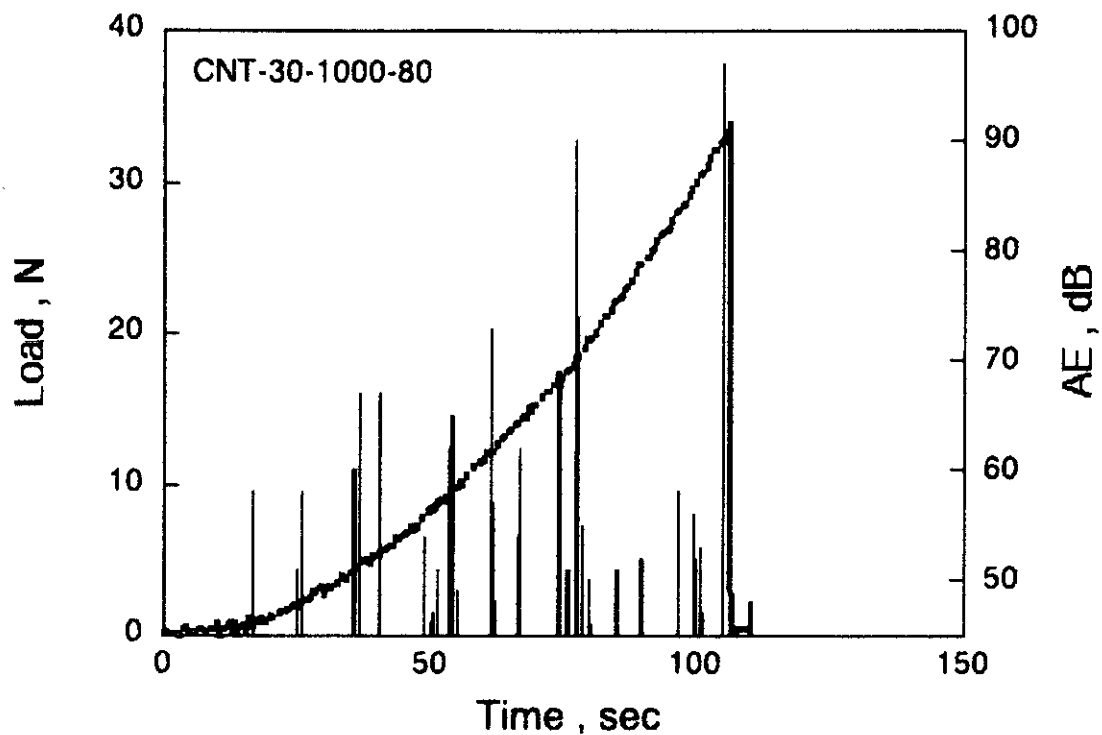


Fig. 3(a) 荷重と AE 発生挙動の時間変化 (CNT-30-1000-80)

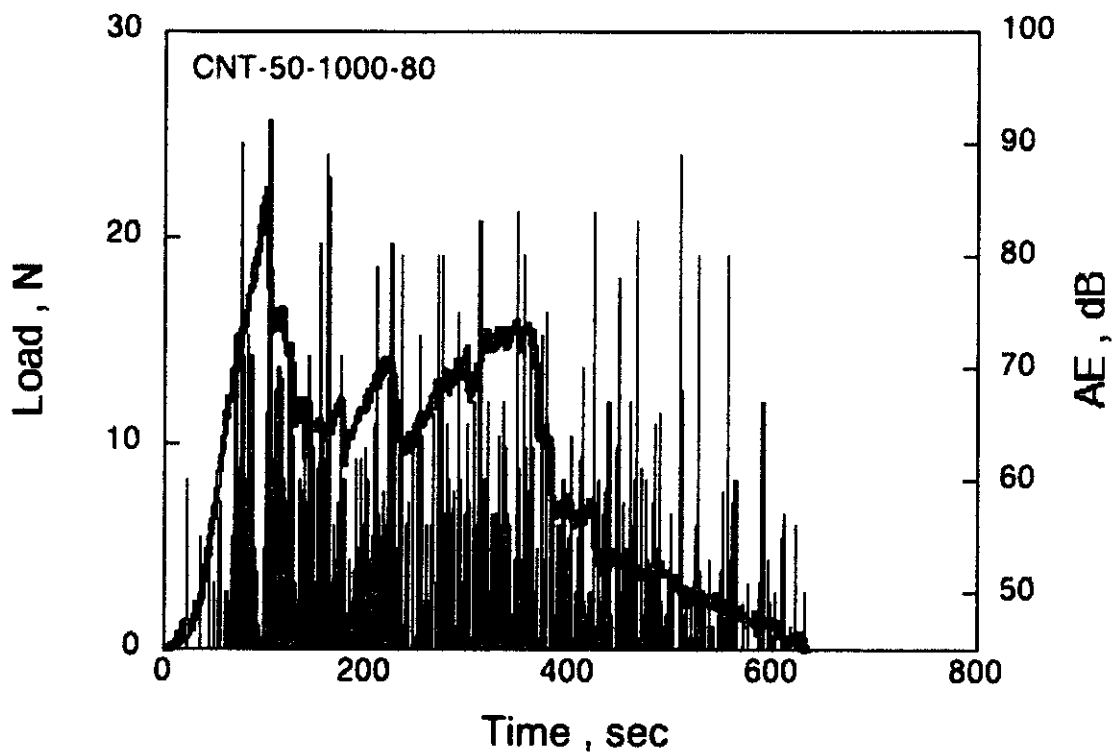


Fig. 3(b) 荷重と AE 発生挙動の時間変化 (CNT-50-1000-80)

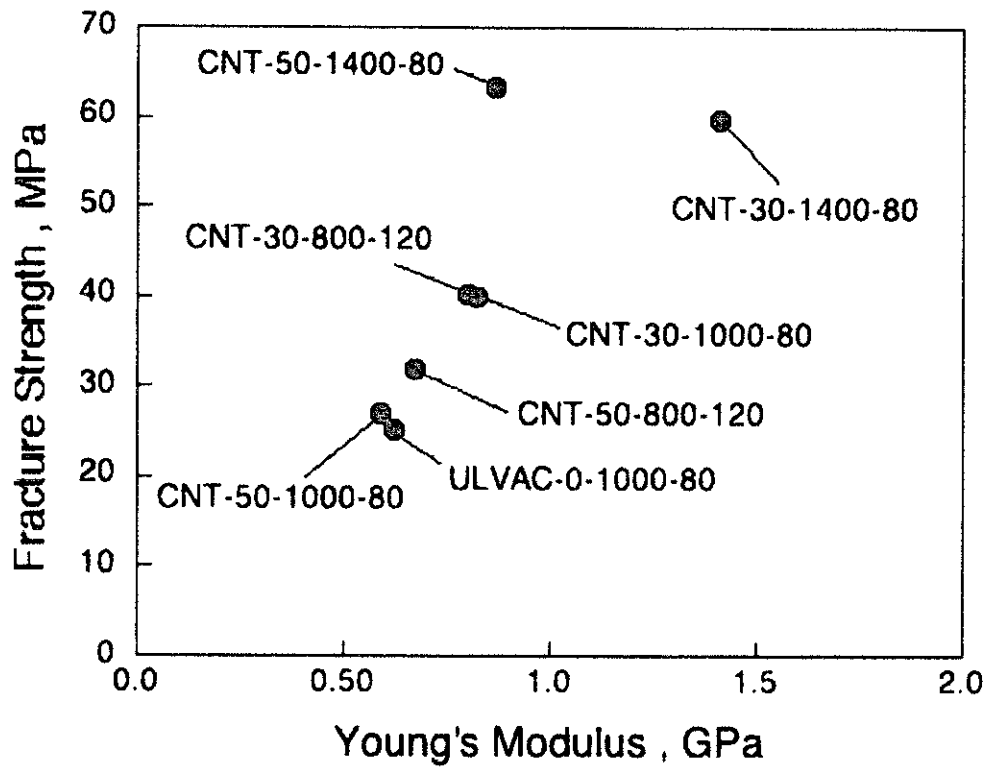


Fig. 4(a) 弾性率と破壊強度

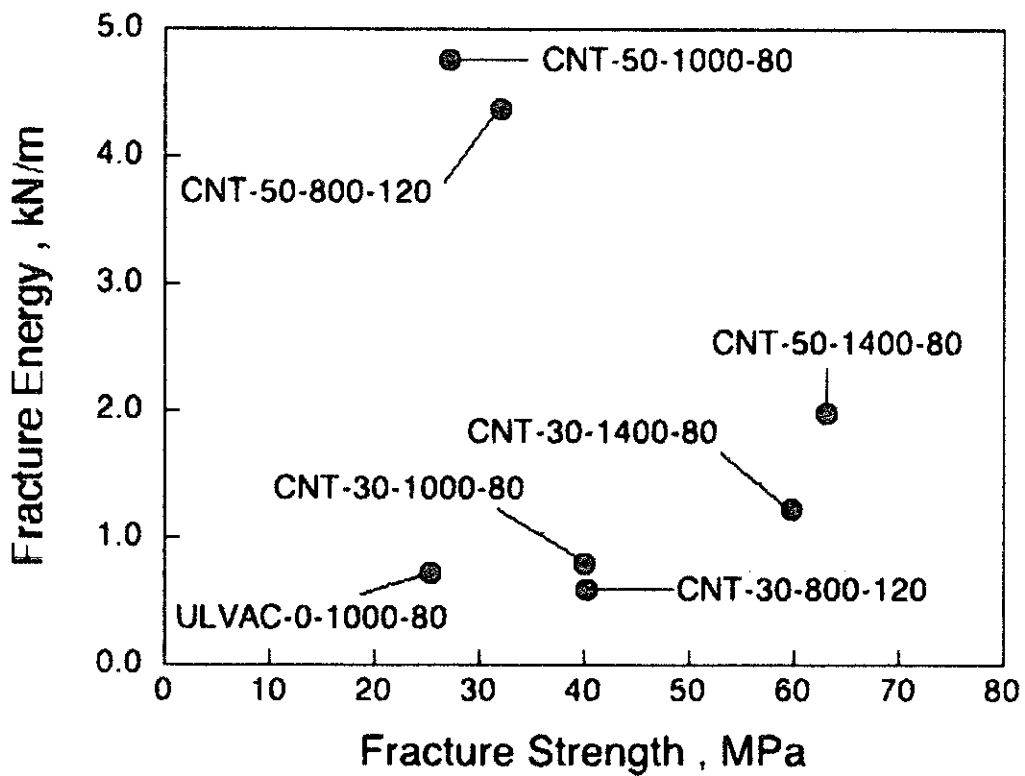


Fig. 4(b) 破壊強度と破壊エネルギー

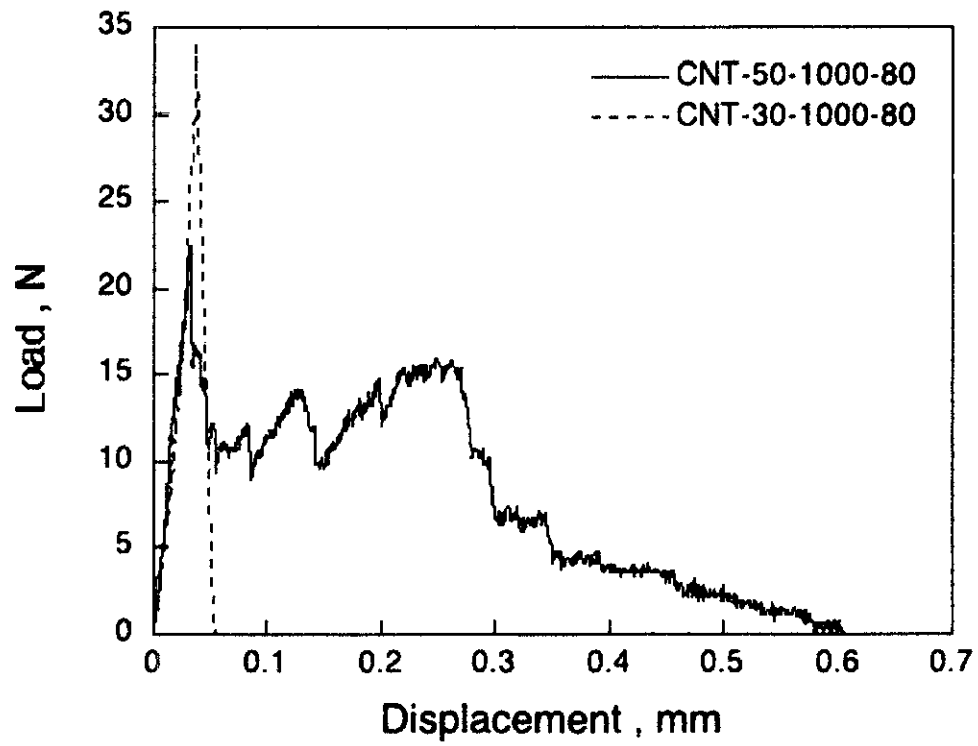


Fig. 2 荷重—荷重線變位曲線

Table.1 CNT 固化体作製条件

Specimen	Phenol Resin (%)	Temperature (°C)	Pressure (MPa)	Density (g/cm ³)
CNT-30-1000-80	30	1000	80	1.46
CNT-30-1400-80	30	1400	80	1.41
CNT-50-1000-80	50	1000	80	1.36
CNT-50-1400-80	50	1400	80	1.35
CNT-30-800-120	30	800	120	1.50
CNT-50-800-120	50	800	120	1.46
ULVAC-0-1000-80	0	1000	80	1.34

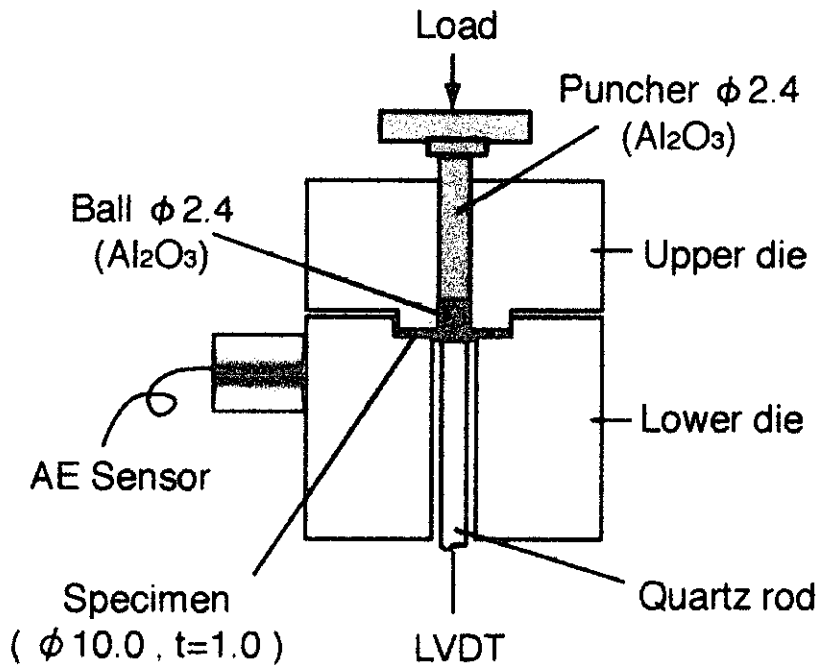


Fig. 1 SP 試験装置概略図

分担研究報告書

ナノチューブ，ナノ微粒子の単体および集塊の組織反応に関する研究

分担研究者	川崎貴生	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	横山敦郎	北海道大学歯学部附属病院講師
研究協力者	野田坂佳伸	北海道大学歯学研究科助手
研究協力者	向後隆男	北海道大学歯学研究科教授

研究要旨 本研究においては、ナノチューブ，ナノ微粒子の生体への応用を最終的な目的として、本年度においてはナノチューブ，ナノ微粒子の単体および集塊に対する *in vivo* での組織反応を検索した。試料として、フラーレン集塊，ナノロッド集塊，水溶性ナノロッドおよび焼結したナノチューブを用い、実験動物としてラットを使用し、皮下および骨髓腔内に埋入後、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて観察した。いずれの試料を埋入した場合でも周囲組織には壊死や好中球の浸潤などは観察されず、器質化としての線維性結合組織による被包化が認められた。埋入した試料の粒子は、マクロファージや異物巨細胞により貪食され、ライソゾーム内に観察されたものも認められた。以上の結果から、ナノチューブ，ナノ微粒子を生体内に埋入した場合、強い炎症反応は生じず、食細胞により貪食されることが示唆された。

A. 研究目的

超高齢化社会が到来しつつある現在、医療費の増大は、国家財政の大きな問題の一つとなっている。効果的に医療費を投下するためには、治療効果が高い治療法が開発されていることが前提となる。そのため、様々な分野で新しい治療法を開発する努力が行われている。治療効果としては、短期間で治療の効果が得られ、その効果が継続することが重要となる。移植から再生医療へ、あるいは薬剤の服用からドラッグデリバリーシステムへ研究が進んできたのは、まさしくこれを目指し

ている。これらの研究に必須である新しい生体材料の開発は、医学の発展のみならず、国民の健康・福祉そして QOL に大きく寄与できるものである。

以上の状況を鑑み、我々は工業界で新素材として注目されている、ナノチューブおよびナノ微粒子に着目した。これらを、DDS のキャリアや再生医療の際の細胞のスキヤホールドに用いることを考案した。本研究の最終的な目的は、ナノチューブ，ナノ微粒子およびこれらからなる複合材料の生体への応用であるが、本年度においては、ナノチューブ，ナノ微

粒子の単体および集塊に対する *in vivo* での組織反応を検索することを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

- 1) フラーレン集塊
- 2) 金属粒子を除去したナノロッド集塊
- 3) I型アテロコラーゲン浸漬ナノロッド

水溶化処理を施したナノロッドを凍結乾燥したウシ皮膚由来のI型アテロコラーゲンに浸漬し、凍結乾燥させた。

4) SPSにて焼結したカーボンナノチューブ

カーボンナノチューブをフェノールレジジンと種々の割合で混合し、放電プラズマシステム (SPS)で 800℃、120MPa の条件で焼結後、エレクトロンビーム蒸着によりチタンをコーティングした。

2. 方法

1) 動物埋入実験

フルーレン集塊、金属粒子を除去したナノロッド集塊およびI型アテロコラーゲンに浸漬した水溶性ナノロッドについては、6週齢雄性ウイスター系ラットを Pentobarbital Sodium の腹腔内注射による全身麻酔を行った後、腹部に切開を加え皮下にポケットを形成し、フルーレン集塊および金属粒子を除去したナノロッド集塊については約 5mg を、I型アテロコラーゲン浸漬ナノロッドに関しては、約 0.5ml を埋入し、縫合した。埋入 1週間後に Pentobarbital Sodium による全身麻酔後、10%中性ホルマリンにて灌流固定を行い周囲組織とともに摘出した。

SPS 焼結カーボンナノチューブについては、1×1×5mm の大きさの試料に調整後、14週齢雄性ウイスター系ラットを全身麻酔後、腹部に形成したポケットに埋入した。その後、大腿部

に切開を加え、筋肉および骨膜を鈍的に剥離し、大腿骨を露出後、骨中央部を歯科用バーにて骨髓に至る骨欠損部を形成した。この欠損部より骨髓腔内に試料を埋入し、骨膜、筋肉および皮膚を縫合した。埋入後8週間でエーテルの吸入により安楽死させ、周囲組織とともに摘出した。

2) 検索方法

フルーレン集塊、金属粒子を除去したナノロッド集塊およびI型アテロコラーゲンに浸漬した水溶性ナノロッドについては、0.05M カコジレイト緩衝液(pH7.3)で調整した4%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド混合液で浸漬固定した。その後、通法に従いパラフィン包埋を行い、薄切後、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色を行い光学顕微鏡にて観察した。一部の試料については、Epon812に包埋後、透過型電子顕微鏡(TEM)にて観察した。さらに一部の試料については、固定後走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

SPS 焼結カーボンナノチューブについては、10%中性ホルマリン溶液にて固定後、皮下に埋入した試料については、試料を可及的に力をかけずに除去し、通法に従いパラフィン包埋を行い、薄切後HE染色を施し、光学顕微鏡で観察した。大腿骨骨髓腔に埋入した試料については、アルコール上昇系列で脱水後、メチルメタクリレートに包埋し、非脱灰研磨標本を作製し、光学顕微鏡で観察するとともに電子線プローブマイクロアナライザー(EPMA)で元素分析を行った。

(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

1) フルーレン集塊について

フラーレン集塊は、結合組織に覆われていた (Fig. 1). 集塊中には数十~100 μm 程度の粒子が観察され、粒子近傍に線維芽細胞および線維芽細胞が産生したコラーゲン線維が認められた (Fig. 2). 粒子の表面には、多数の異物巨細胞やマクロファージが観察された (Fig. 3).

TEM による検索では、異物巨細胞の細胞質内には多数のライソゾームが観察され、一部のライソゾーム中に 100nm 程度のフラーレン粒子が認められた (Fig. 4).

SEM にて、フラーレン粒子部分を拡大すると、30nm 程度の粒子および直径 50nm 程度の線維状の構造が観察された (Fig. 5).

2) 金属粒子を除去したナノロッドについて

試料集塊は、フラーレン埋入の場合に比較し薄い線維性結合組織の被膜で覆われていた (Figs. 6 and 7). ナノロッド粒子は、フラーレンに比較し小さなものが多く、粒子周囲には多数のマクロファージや異物巨細胞が認められた。これらの食食系細胞の細胞質内にも、ナノロッドの小さな粒子が観察された (Fig. 8).

SEM による観察においても、試料表面にコラーゲン線維が多数観察された (Fig. 9).

TEM による検索において、マクロファージおよび異物巨細胞内に多数の貪嚙されたナノロッド粒子が観察された (Fig. 10). ナノロッドの粒子の多くは、膜に覆われており、ライソゾーム内に認められたが、一部に膜構造が観察されないものも認められた (Fig. 11). ナノロッド粒子の形状は矩形を示すものが多く、大きさは数十~100nm のものが多く認められた。

3) I 型アテロコラーゲン浸漬水溶性ナノロッドについて

アテロコラーゲンペレットは、細胞成分を比較的多く含む線維性結合組織に被覆されていた (Fig. 12). ペレットは、太いコラーゲン線維

より構成され、線維間には間葉系細胞やマクロファージが、散在しているのが観察された。ペレット表面の一部には、ナノロッドが観察された (Fig. 13).

TEM による観察では、アテロコラーゲンの線維間あるいは線維中に数百 nm 程度のナノロッドの凝集塊が認められた (Fig. 14). この部分をさらに拡大すると、凝集塊は、直径数 nm、長さ数十 nm の線維状のナノロッドから構成されていた (Fig. 15). マクロファージには、ナノロッドは多数観察されたが、ライソゾーム内に認められるものと細胞質内に認められるものが観察された (Fig. 16).

4) SPS 焼結カーボンナノチューブについて

フェノールレジン含有量が 30% の試料は、十数層からなる線維性結合組織に被包されていた (Fig. 17). 線維性結合組織の一部には、剥離した試料の小片が観察され、炎症性の細胞浸潤や毛細血管の拡張が認められた (Fig. 18).

フェノールレジンの含有量が 50% の試料については、30% の試料に比較し周囲組織の炎症は強く、円形細胞浸潤や異物巨細胞が観察された (Fig. 19).

骨髓腔内に埋入した試料については、試料は骨髓腔のほぼ中央に位置しており (Fig. 20), 周囲には層状の新生骨が認められたが、試料表面に直接接する新生骨はほとんど観察されず、試料と新生骨の間には、骨髓組織が観察された (Fig. 21 and 22).

EPMA による観察において、新生骨を表すカルシウムは、既存の皮質骨に強く検出された。炭素強度の強い試料周囲に、カルシウムは認められるものの試料表面には検出されず、組織標本と同様であった (Fig. 23). チタンについては、ほとんど検出されなかった (Fig. 24).

D. 考察

1. フラーレンおよびナノロッドについて

フルーレンおよびナノロッドの集塊は、光学顕微鏡による観察では、埋入後1週間で線維性結合組織に被包されており、異物反応としての器質化が進行しているものと推察される。フルーレンについては、粒子が凝集する傾向が強いためか、多核の異物巨細胞が粒子表面に観察されたが、ナノロッドに関しては、粒子の大きさが多様であるため、小さな粒子はマクロファージに貪食されていた。これらの所見は、耐食性が高く生体内で安定であるチタン粒子を埋入した場合と同様であり、壊死などの強い炎症反応は生じないものと考察される。透過型電子顕微鏡による観察では、チタンやハイドロキシアパタイトの粒子を埋入した場合と同様に、ライソゾーム内に認められるものが多かったが、一部に膜に被包されておらず、ライソゾーム内に存在していないと考えられるナノロッドが認められた。これは、ライソゾームに取り込まれずに細胞内に取り込まれたためと推察されるが、今後さらなる研究が必要となるであろう。ライソゾーム内で凝集していたナノロッドどうしが分離したとも考えられるが、この点についても *in vitro* の実験を含めたさらなる研究が必要であろう。

2. 水溶性ナノロッドについて

水溶性ナノロッドは、肉眼的には可視できないため、そのまま動物内に埋入することが不可能であった。このため、凍結乾燥したアテロコラーゲンに含浸させる手法を考案した。アテロコラーゲンは、コラーゲンの抗原性に関するテロペプチドを除去したものであり、抗原性は低く、我々もこれまで BMP (Bone Morphogenetic Protein) のキャリアに使用しており、良好な結果を得ている。本研究においても、アテロコラー

ゲン周囲には、埋入1週後であっても強い炎症反応は観察されず、線維間にわずかに間葉系細胞が観察されたにすぎなかった。また、このアテロコラーゲンを使用した埋入方法は、結果に示したようにアテロコラーゲンペレットの表層にナノロッドを位置させることに効果的であった。

水溶性ナノロッドは、金属粒子を除去したナノロッド集塊に比較すると、大きさは小さく、直径数 nm、長さ数十 nm 程度であった。この水溶性ナノロッドも、ナノロッド集塊と同様にマクロファージに貪食されていたが、ライソゾーム内に存在するもの、膜構造に被覆されておらずライソゾーム内に存在しないものが認められた。この違いについてはさらに *in vitro* でのマクロファージの培養などさらに詳細な電子顕微鏡を用いた検索が必要であろう。

3. SPS 焼結カーボンナノチューブについて

結果に示したように含有するフェノールレジンが多いもののほうが、異物巨細胞が試料表面に観察され、周囲組織の毛細血管や円形細胞の数は多く、フェノールレジンの起炎性が推察された。骨髓腔に埋入した場合においても、骨組織との適合性に優れるチタンに比較すると、試料が直接骨組織と接している部位は少なく、人工歯根など骨組織を対象とした生体材料としては改良の必要性が示唆された。焼結後のチタンの被覆については、EPMA で明確には検出されなかったことから、被膜厚さが薄すぎたあるいは剥離したことが考えられるが、骨組織との適合性とも関連することであり、今後さらに検討しなければならないものと考えられる。

E. 結論

ナノチューブ、ナノ微粒子の単体および集塊に対する *in vivo* での組織反応を検索すること

を目的として、フラーレン、ナノロッド集塊、水溶性ナノロッドおよび SPS にて焼結したカーボンナノチューブをラット皮下および骨髄腔に埋入した結果以下の結論を得た。

1. フラーレン、ナノロッド集塊、水溶性ナノロッドについては、周囲組織に強い炎症反応は惹起しなかった。
2. SPS で焼結したカーボンナノチューブについては、含有するフェノールレジン量が、周囲組織の炎症の程度に関係した。
3. フラーレンおよびナノロッドは、多くはマクロファージや異物巨細胞に貪食されるが、膜構造に被覆されず、ライソゾーム内に観察されないものも認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) A.Yokoyama, S.Yamamoto, T.Kawasaki, T.Kohgo, M.Nakasu. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials *Biomaterials* 23. 1091-1101, 2002
 - 2) Y.Tamura, A.Yokoyama, F.Watari, M.Uo, T.Kawasaki Mechanical properties of surface nitrided titanium for abrasion resistant implant materials *Materials Transactions* 43. 3043-3051, 2002
 - 3) Y.Tamura, A.Yokoyama, F.Watari, T.Kawaski Surface properties and biocompatibility of nitrided titanium for abrasion resistant implant materials *Dental Materials Journal* 21.355-372, 2002
 - 4) A.Yokoyama, H.Matsuno, S.Yamamoto, T.Kawasaki, T.Kohgo, M.Uo, F.Watari, M.Nakasu.

Tissue response to a newly develop calcium phosphate cement containing succinic acid and CM-chitin *Journal of Biomedical Materials Research* 63. 491-501, 2003

2. 学会発表

- 1) 川崎貴生, 横山敦郎 ナノチューブ, ナノ微粒子, マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用 *in vitro* 生化学的解析, *in vivo* 動物埋入実験, 臨床応用基礎開発 単体/集塊の動物埋入実験 ナノチューブ, ナノ微粒子, マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用 平成 14 年度第一回目標策定研究発表会抄録集 40-41, 2002
- 2) 田村豊 耐摩耗性を有する表面窒化チタンインプラントの特性と生体適合性 平成 14 年度北海道歯学会秋期学術大会 2002
- 3) 横山敦郎, 川崎貴生, 野田坂佳伸, 向後隆男, 古月文志, 大森守, 田路和幸 カーボンナノチューブ皮下埋入における周囲組織の反応 ナノチューブ, ナノ微粒子, マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用 平成 14 年度第二回研究発表会抄録集 28-31, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

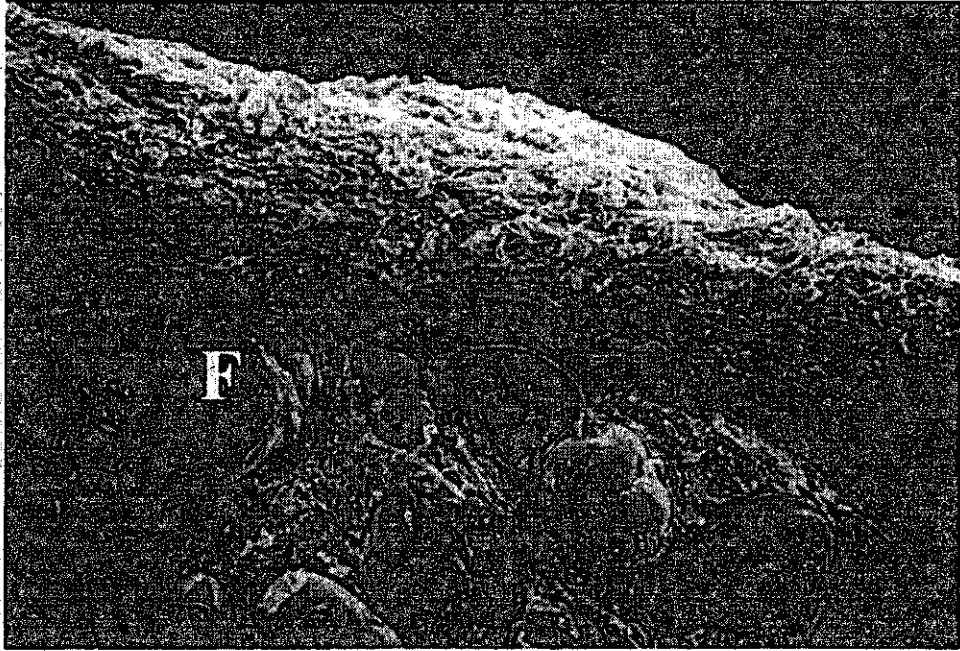


Fig.1

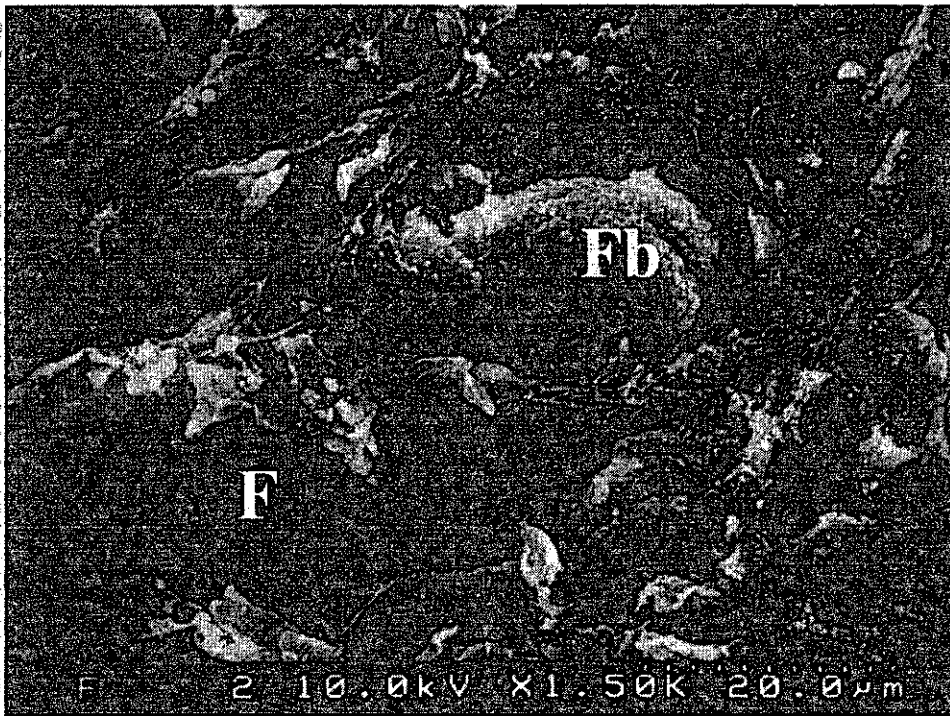


Fig. 2

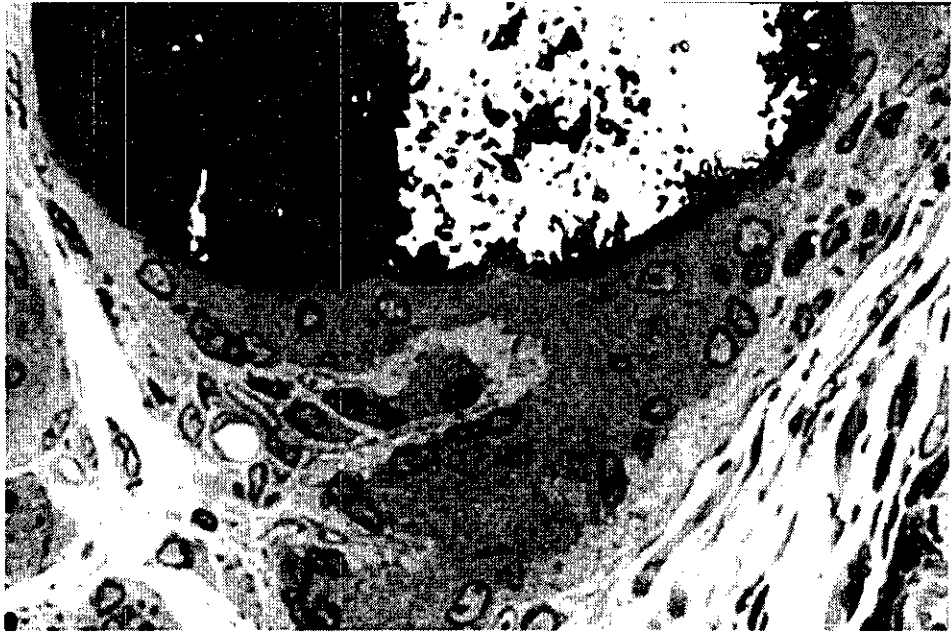


Fig. 3

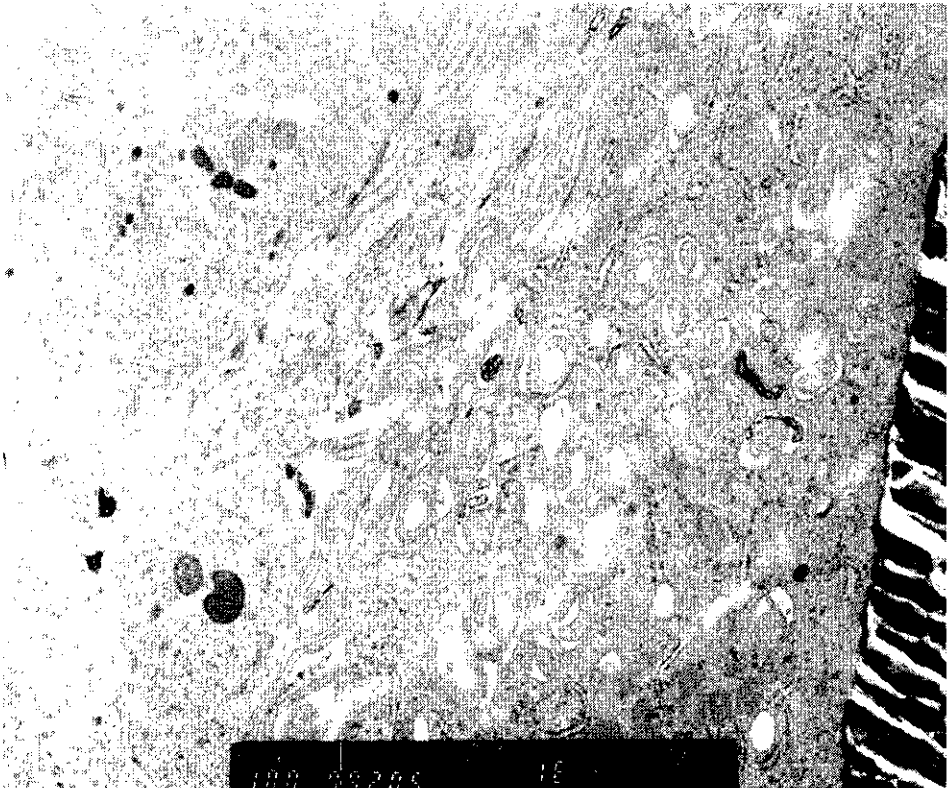


Fig. 4

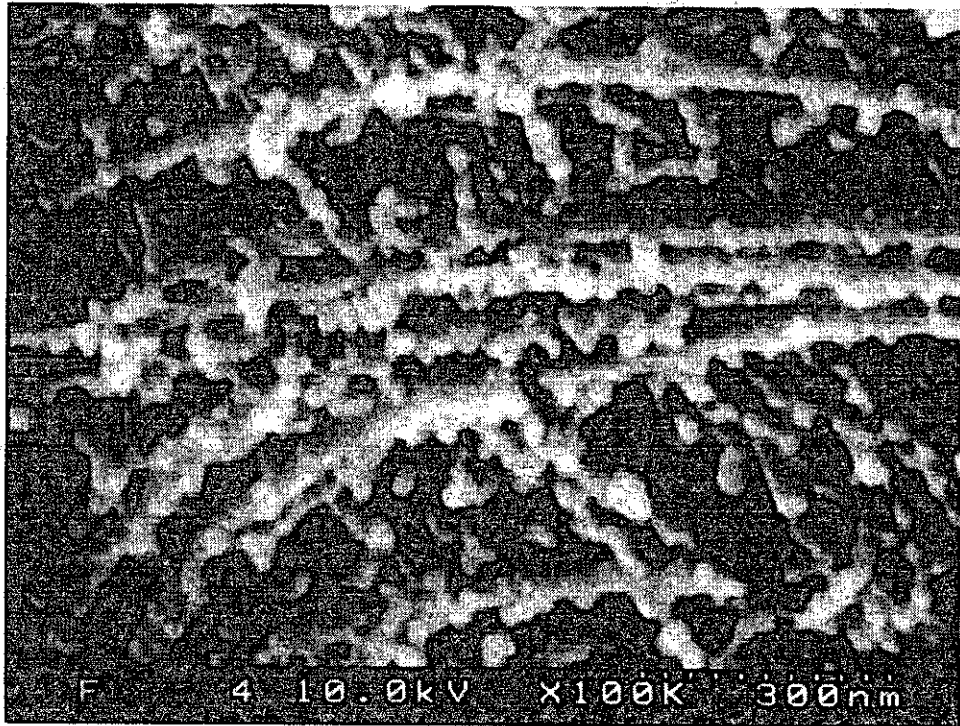


Fig. 5

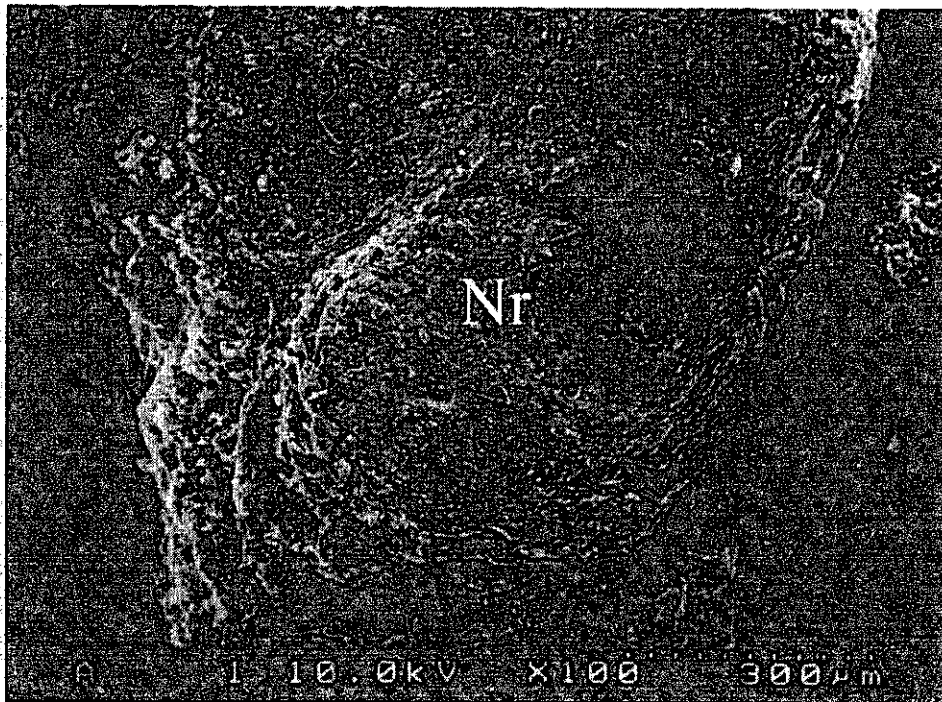


Fig. 6