

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進事業

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 亘理 文夫

平成 16(2004)年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

- 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……1  
亙理 文夫

### (研究協力者報告)

- a. カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用……37  
赤坂 司
- b. カーボンナノチューブならびにカーボンナノロッドによる……69  
マクロファージならびにマウス脾臓細胞の活性化  
柴田 健一郎
- c. カーボンナノチューブ・ファイバーの筋芽細胞ならびに……76  
骨芽細胞培養系における細胞増殖活性に及ぼす影響  
田村 正人
- d. カーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウムコンポジットコロイド……84  
特性および生体適合性の研究とバイオテクノロジー応用  
古月 文志
- e. カーボンナノチューブの細胞に対する影響……93  
－細胞増殖と抗酸化機能に関して－  
柴 肇一
- f. カーボンナノチューブを用いた複合材料の作製と評価および……101  
カーボンナノカプセルの生体為害性の調査に関する研究  
宇尾 基弘
- g. 乳化溶媒蒸発法によるマイクロパーティクル形成……111  
ロスカ・イオシフ・ダニエル
- h. X-線を用いたナノクラスターキャラクタリゼーション手法の開発研究……128  
朝倉 清高

## II. 分担研究報告

1. バイオ応用を目指した水溶化カーボンナノチューブ・ナノファイバ……135  
のサイズ制御、及び磁性ナノ粒子に関する研究  
田路 和幸
2. ナノ微粒子の生成・物性および生体に与える電磁気的影響……155  
羽田 紘一

3. ナノ・マイクロ微粒子の生体材料への応用に関する研究.....	167
ナノ・マイクロ微粒子に対する <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での 細胞・組織反応 戸塚 靖則	
4. 多層カーボンナノチューブの固化とハイドロキシアパタイト被覆に関 する研究 大森 守	192
5. 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	206
6. ナノ微粒子の生体材料への応用に関する研究 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> でのナノ微粒子への組織反応 川崎 貴生、横山 敦郎	224
7. 高分子膜の構造制御による医療用アクチュエータへの応用.....	251
野方 文夫	
 III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	263
 IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	269

厚生労働科学研究費補助金  
(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

総括研究報告書

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

主任研究者 巨理 文夫 北海道大学大学院歯学研究科 教授

研究要旨

「ナノテクノロジーは新しい機能性を生み出すとともに、新たな毒性の発生源ともなるのか？」という問題がナノトキシコロジーとして最近指摘され始めた。生体親和性に富むチタンのようなバイオマテリアルでも、微粒子になりサイズが小さくなると組織刺激性を示すようになる。

微粒子のバイオ応用を図る上で、材料のマイクロ・ナノサイズ化によって特異的に発現する組織反応性をまず明らかにする必要がある。ヒト好中球、歯根膜細胞、マクロファージ、ゾウリムシほかの各種細胞を用いた機能性試験(in vitro)により細胞生存率、増殖率、LDH、活性酸素、サイトカイン TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-8, M-CSF 産生を調べ、埋入試験(in vivo)により組織反応の病理学的検索を行った。

およそ 100  $\mu$  m 以上のチタン粒子は巨視的サイズのインプラントと同様の生体親和性を示すが、50  $\mu$  m 以下では刺激性が亢進し、特に 10  $\mu$  m 以下になると貪食作用を誘発し、長期間炎症反応を引き起こす。

このような効果はチタン、鉄の金属、二酸化チタン、磁性微粒子の酸化物、ポリ乳酸の高分子のいずれの材料にも見いだされ、物質によらない効果であると考えられる。そのメカニズムは微粒子と細胞・組織とのサイズの相対的な関係に由来する効果である。

即ち、マクロサイズの生体適合性には通常、溶解イオンとして発現する材質依存的な化学的効果が支配的であるが、 $\mu$ m ~ nm になると bioactive, bioinert 材料でも、材質非依存的に微粒子の物理的サイズ効果による細胞毒

性が顕現化する。

その為害性の程度は細胞内毒素に比べると 1/1000 以下と低いが、組織内では貪食を誘発し、金属微粒子の場合には細胞死を導いて局所に残留し長期間炎症を継続する点で注意が必要である。

最も代表的なナノパーティクルであるカーボンナノチューブについては bioinert 材料一般に起きる程度の微粒子刺激性は有するものの、短期的にはアスベストに見られるような特異的な生体為害性は認められなかった。むしろ生体材料として有利な細胞・組織に対する特徴的な種々の親和性が多数見出された。

こうしたカーボンナノチューブのバイオ応用を可能にするために、可溶化したナノチューブのサイズ調整、親水性カーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウムコロイドの作製、細胞・細菌との結合性を制御する糖鎖修飾および骨誘導性を導くアパタイト析出による表面修飾法を開発した。

カーボンナノチューブ単体のバイオ応用として、良好な細胞付着性を利用して、スcaffoldsの作製と細胞培養への応用、コラーゲンとの相互作用による歯質への選択吸着、アルジネートカプセルによる経口投与・体内吸収、カーボンナノカプセルの血管内投与、カーボンナノチューブ複合材料の試作、遺伝子導入用担体への応用を行った。

放電プラズマ焼結で作製した多層および単層カーボンナノチューブ固化体は骨に類似した物性を有し、セラミックスとしてきわめて特異的な擬似塑性変形と高い破壊靱性を示す。また固化カーボンナノチューブとチタン表面に水熱合成により、ハイドロキシアパタイトコーティング膜を形成することに成功した。

金属系および酸化物系磁性ナノ微粒子を合成し、ゾウリムシの生存及び細胞増殖に及ぼす影響を調べるとともに、センチネルリンパ節検出法としての医療応用モデル試験を行った。

放射光を用いた EXAFS 法によるナノチューブ中の金属触媒の合金クラスター構造解析、光電子顕微鏡開発を行った。

ナノ構造制御した膜状電解質高分子膜の表面に、ドータイト塗布、PMMA 被覆することにより、医療用アクチュエータへの応用上の課題である耐久性、弾性率、発生力の向上、応力緩和の抑制を達成し、マイクロポンプを試作した。

分担研究者		
大森 守	東北大学金属材料研究所 附属新素材設計開発施設	助手
田路 和幸	東北大学大学院工学研究科	教授
橋田 俊之	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	教授
戸塚 靖則	北海道大学大学院歯学研究科	教授
川崎 貴生	北海道大学大学院歯学研究科	教授
横山 敦郎	北海道大学医学部歯学部附属病院	講師
野方 文雄	岐阜大学工学部	教授
羽田 紘一	石巻専修大学理工学部	教授

## A. 研究目的

### I. ナノ/マイクロ微粒子と生体適合性

#### A 1. 微粒子と生体反応

##### (1)生体反応性に及ぼす材料の微粒子効果

チタンは金属中、最も生体親和性に富むとされ、ニッケル等に起因する金属アレルギーの患者にはチタンによる代替が有効であり、またインプラントには最もよく使用されている。しかし用途によっては必ずしもすぐれた臨床報告ばかりではない。重大な問題点として耐摩耗性に劣る点があり、大腿骨人工関節等のインプラントでは骨頭摺動部で発生した微細な摩耗粉が為害性を惹起する。

マクロサイズでの生体親和性に対し、ミクロな微粒子が為害性を示すことは生体に対する作用機序が一様ではないことを示唆する。マクロとミクロの境界となる臨界寸法はどれだけか、

生体適合性のサイズ依存性の原因はなにか、そのメカニズムを解明することが必要である。

こうした問題意識のもとに、我々は昨年度(平成14年度)、下記のように材料の生体適合性に対する生化学的評価方法を導入し、微細な粒子状態が生体適合性に及ぼす影響について細胞機能性試験(in vitro)および動物埋入試験(in vivo)で調べることを第1の目的として研究を行った。

##### (2)材料の生体適合性に対する生化学的評価方法の導入

従来、生体材料の評価には細胞の生死、形態変化、溶血性を指標とする細胞毒性試験や炎症反応の有無、被包化、骨形成を観察する動物試験が行われてきたが、いずれもマクロな生体反応現象の観察から判定するものであった。本研究ではこうした微粒子の生体親和性に及ぼすサイズ依存性を解明するために、サイトカイン検出など各種細胞機能性試験の生化学的手法に基づく材料の評価法を導入し、為害性発現のプロセスを解析する材料の生体適合性に対する生化学的評価方法の導入した。

同時に動物埋入実験に基づく組織反応の病理学的観察を併せ行うことにより、巨視的寸法のインプラントとは異なる、微細な粒子状態が生体適合性に及ぼす影響について細胞機能性試験(in vitro)および動物埋入試験(in vivo)で調べることを第1の目的として研究を行った。その結果、以下を明らかにした。

##### (3)生体適合性の微粒子サイズ依存性

チタンはマクロサイズで生体親和性を示すが、ミクロな微粒子になると為害性を惹起し、その程度はサイズに依存する。細胞生存率、LDH・活性酸素・サイトカイン放出量、細胞の形態変化等の in vitro 細胞機能性試験と in vivo 動物埋入試験はともに、臨界粒径およそ 100  $\mu$  m を境としてそれ以上では生体親和性を示し、それ以下ではサイズの縮小とともに細胞刺激性が亢進し、特に細胞よりも小さな 10  $\mu$  m 以下では貪食を誘発し、顕著な細胞毒性を発現する、という結果で一致した。ICP 元素分析ではイオン溶出は認められず、物理的サイズに由来する細胞毒性効果である。

生体為害性の少ない材料としては共通であるが化学的にはイオン不溶出の Ti と大量に溶出する Fe あるいは酸化物の  $TiO_2$  と、特性の異なる微粒子のいずれも、物質によらずサイトカイン放出量が定量的にもよく似た細胞刺激性を示した。Ni のように生体為害性の強い金属では化学的効果の影響を受けるが物理的サイズ依存性は同様に示している。 $\mu m \sim nm$  領域で微粒子による物理的サイズ効果が支配的になることを示している。

通常バイオマテリアルとして扱っている  $mm, cm, \mu m$  のマクロサイズ領域ではこうした物理的効果は無視できるほど小さく、生体適合性は主としてイオン溶出による化学的効果に依存する。しかしおよそ  $100 \mu m$  の臨界径以下になるとサイズ効果、形状効果等の物理的因子が次第に顕在化し、この傾向は  $\mu m$  から  $nm$  領域まで続いている。

#### (4) ナノトキシコロジー

我々の問題意識は摩耗粉の生体為害性から出発したが、既に微粒子は様々な分野で利用されている。歯科材料では印象材、石膏、埋没材、歯科用セメント、床用レジン、アマルガム、研磨材等、長期保管性の便から、組成内容を粉と液に分離して保管し、使用前に混和して硬化体を治療に用いる粉液法が多用されている。同じ材質でもこのときの粉末粒子の形態、サイズ、粒度分布、気孔率等は混和時の操作性、硬化体の物性・耐久性に深く影響する。歯質、歯科補綴物の切削、研削、研磨を含め、歯科医療にたずさわる歯科医師、歯科技工士、歯科衛生士は粉末が関与する環境下で作業することが多い。

またこうした専門領域に限らず、日常生活において化粧品、薬剤、洗剤、ペイントなど一般国民の身近に使われている様々な大衆商品がある。

一方、21世紀の少子高齢社会で若年者層への負担の大きい21世紀日本を支える技術としてIT、バイオ等の分野において新たな機能性を生み出すナノテクノロジーの開発が産学官で大々的に進められており、必然的に材料のマイクロ/ナノ微細化が進展している。

しかしここにきて最近、ナノトキシコロジー

として微細化により毒性もまた顕著になると危険性を指摘する記事が欧米から出されてきた。例えば、

「ナノテクが新たな有害物質を生む? - 最新電子顕微鏡が明かすナノ粒子の素顔 -

ナノテクが新たな有害物質を生む? ナノテクノロジーによって生み出された新しい微粒子が人体にもたらす健康リスクについて、懸念が寄せられている。粒子は小さくなるにつれて化学反応性が高まるが、毒性もまた高くなると危惧される ...。」 メールマガジン < <http://www.hotwired.co.jp/news/news/20040115302.html> >

ナノトキシコロジーの問題はナノテクノロジー推進により現れた DDS やカーボンナノチューブ等、現在、開発中で新しい機能性に注目したナノマテリアル、ナノパーティクルの安全性の再検討を迫るものであり、その帰結はカーボンナノチューブ等、日本発の新規機能性材料・技術の重点開発動向の今後を左右する重要課題である。

のみならず、ナノパーティクルは化粧品や薬剤など、従来既に多くの医薬品、健康関連商品に使用されており、国民が日常的に使用する一般大衆商品まで及ぶ点でその影響は特に重大である。

こうした安全性の再検討問題には科学的根拠に基づく対応が求められる。しかしこの点に関し現状では判断に資する具体的な研究はあまり見あたらない。

ナノテクノロジーやナノマテリアルおよびカーボンナノチューブの危険性の可能性に関する報道の多くは具体的な研究データに基づかないままに議論が進められおり、細胞機能性試験や動物埋入実験による本格的な研究は少ない。

中でも代表的なナノマテリアルとして、日本で最初に発見されその応用開発が進められているカーボンナノチューブについては、繊維状結晶という肺ガンを引き起こす発ガン性物質としてのアスベストと類似の形態を持つ連想から、同様な毒性と危険性をもつのではないかという指摘が多いようである。

#### (5) 本研究の位置づけと目的

ナノテクノロジーは新しい機能性を生み出す

とともに、新たな毒性の発生源ともなるのか？  
ーナノマテリアル、ナノメディシン開発はこの  
ナノトキシコロジーの問題に回答するために、材  
料がマイクロ/ナノサイズ化したときの生体反応  
性を生化学的手法で評価し、判断基準となるデ  
ータの提供に基づく適正な指針のもと、バイオ  
応用展開を図ることが望ましい。

既に本研究は他に先駆け、こうした問題を研  
究対象としてバイオマテリアルの生体適合性の  
生化学的手法に基づく評価法の確立と生体反応  
性のデータの提供を行ってきた。そして摩耗粉  
等の微粒子に対する生体反応、作用機序の解明  
を試み、ナノ/マイクロ微粒子になると、従来  
知られているマクロな生体反応で支配的な、イ  
オン溶出に基づく化学的効果としての生体為害  
性とは異なる、物理的なサイズ依存性を有する  
細胞毒性が顕在化することを報告した。またナ  
ノチューブのバイオ応用開発研究も行っている。

ナノトキシコロジーの問題はナノマテリアル  
の開発の意義と将来性について問題を投げかけ、  
ますます微粒子の生体反応性とバイオ応用の研  
究の重要性を認識させることとなった。これに  
基づき本研究は平成14年度と同様、

微粒子の生体親和性に及ぼすサイズ依存性を  
解明するために ①サイトカイン検出など各種  
細胞機能性試験の生化学的手法に基づく材料評  
価法(in vitro)の導入と、in vivo 組織反応性  
試験を併用し、為害性発現プロセスの解析を行  
う。②次にこうした為害性発現の作用機序を把  
握した後、逆にカーボンナノチューブ等のナノ  
/マイクロ微粒子を遺伝子デリバリーシステム、  
組織再生用スカフォールド、生体機能調節因子  
徐放性インプラント等のバイオ応用への開発を  
図る。

平成15年度はこれに加え、新たに生起した  
ナノトキシコロジー問題の評価と判断に関する  
視点からの研究も重点的に行った。

## A 2. 耐摩耗性窒化チタン/アパタイト系傾斜 機能型インプラントの開発

次に摩耗粉に対する生体反応、作用機序の解  
明、その対策は、高齢社会のニーズから是非答  
えなければならない課題である。

平成14年度には摩耗粉に対する対策として  
高硬度の窒化チタン(TiN)に注目し、表面窒化  
チタン(Ti(N))に対して引っかかり硬さ、摩耗試  
験を含む種々の機械的特性試験とバルクインプ  
ラント体と微粒子の動物埋入実験による生体適  
合性の評価を行い、耐摩耗性窒化チタンインプ  
ラントの開発基礎研究を行った。

平成15年度はインプラントの一つの発展形  
態として傾斜機能材料(FGM)の概念を導入した  
耐摩耗性窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型  
インプラントの開発を行った。これはデンタル  
インプラント(人工歯根)のように同一製品内  
で窒化チタンによる耐摩耗性・機械的特性を要  
求する部位と逆にアパタイトによる応力緩和・  
生体親和性を要求する部位がある場合に、各部  
位委間を濃度傾斜させ、界面形成による断絶を  
引き起こすことなく物性を連続的に変化させ、  
それぞれの部位で発揮する機能性の発現を最適  
化しようとするものである。

## II. 微粒子のバイオ応用

細胞、タンパク質、DNA サイズにおける生  
体との相互作用に注目し、その作用機序を把握  
した後はナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ  
微粒子を逆に生体に導入し、バイオ応用展開を  
図ることを本研究事業のもう一つの大きな目的  
とした。

### A 3. 乳化溶媒蒸発法によるマイクロパーティ クル形成

生体吸収性インプラントやタンパク質や  
DNA 等のカプセル化による成長因子の調節徐  
放、DDS 用の移送物質として生分解性ポリ乳  
酸グリコール酸共重合体(PLGA)は最もよく使  
われている。様々な構造のマイクロ球状中空微粒  
子を乳化溶媒蒸発法により作製するとともに、  
微粒子のサイズ及び形態を光学顕微鏡、走査電  
子顕微鏡及びレーザー散乱粒度分析により調べ、  
その形成機構を解析した。

### II-1. カーボンナノチューブ単体のバイオ応 用

また最も代表的なナノ微粒子であるカーボン



ナノチューブに注目し、そのバイオ応用の可能性を検討した。カーボンナノチューブの応用は大きく二つに分けて考えることができる。

ひとつは微粒子のマイクロ単体の利用であり、nm サイズを利用するいわゆるバイオとしての応用である。遺伝子、蛋白質、糖鎖、細胞チップの微粒子への吸着、結合、修飾、付加等により、例えば抗癌剤が健常組織に吸収され重大な副作用を起すのを避け、癌疾患部にのみ薬剤を運搬する DDS(ドラッグデリバリーシステム)や細胞への遺伝子導入のキャリアー材料、組織再生時のスカフォールド(担体)等への応用が考えられる。

## II-2. バイオ用カーボンナノチューブの開発 (1)バイオ用試料調整の課題

以上の実現のためにはまずバイオ用カーボンナノチューブの開発が必要である。現状のカーボンナノチューブにはアモルファスカーボン、金属触媒が混在し、粒子どうしが凝集しているため、そのままではバイオ応用には使用できない。バイオ応用の目的のために、大量合成、高純度化、サイズ分布の均一化、適切なサイズ選択、微粒子同士の凝集を防ぎ、可溶・単離・分散化を図る必要がある。またデリバリーシステム、スカフォールド、金属・蛍光ラベリングのためには遺伝子、蛋白質、糖鎖チップ等を微粒子上に吸着、結合、修飾、付加する技術が必要である。これらバイオ用カーボンナノチューブ作製・表面改質に必要な方法を確立することをめざした。

### (2)細胞内単体の観察・評価

これらの試料の合成、形状、分散、単離の確認に高分解能電子顕微鏡観察を行うとともに、放射光を利用し特定元素周囲の原子間距離や配位数などの構造情報を得ることのできる EXAFS 解析、高エネルギー分解能の元素マッピングを行うことのできる EXPEEM 開発も行った。

細胞内導入あるいは貪食作用により取り込まれた細胞内部のナノチューブ・微粒子の確認、評価には、単に微粒子を単独に観察するのとは違った高度な顕微鏡観察技術が必要である。導

入の有無の確認、効果の定量的評価のために表面修飾による蛍光ラベリングを利用した光学的測定法を開発することもめざした。

## A 4. バイオ応用を目指した水溶化カーボンナノチューブ・ナノファイバーのサイズ制御、及び磁性ナノ粒子に関する研究

### (1)バイオ用カーボンナノチューブ・ナノファイバーの可溶化とサイズ制御

カーボンナノチューブ・ナノファイバーなどの特異形状炭素物質は疎水性で凝集しやすく、そのままではバイオ応用には使用することはできない。生体材料(臓器)、HIV、癌治療、遺伝子治療のベクターとして応用するために、可溶・分散性付与と、細胞内に導入するために適したサイズ制御と表面改質を行った。

### (2)酸化物磁性ナノ粒子の合成と医療応用—センチネルリンパ節検出—

医療分野において磁性ナノ粒子は位置検出が可能、外部からの誘導が可能、表面積が大きい、表面に物質を吸着できる、などの利点がある。医療応用に際して磁性ナノ粒子合成段階においての粒子径、粒度分布制御技術が必要不可欠であり、今回は共沈法や酸化法によるマグネタイト粒子径の制御と、ポリオールを用いたコバルト粒子径の制御を行い、医療応用のための磁性ナノ粒子の合成を行った。さらに、センチネルリンパ節検出法への磁性ナノ粒子の適応の可能性を検討した。

## A 5. ナノ微粒子の生成・物性および生体に与える電磁気的影響

### (1)ナノ磁性微粒子の生成と特性

ある種の生物の体内組織で合成されるマグネタイト  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  や光触媒材料の二酸化チタン  $\text{TiO}_2$  等の酸化物系微粒子について、単離・分散した状態で直接得ることのできる方法として液相反応法による合成を、金属微粒子については真空蒸着装置を改良し希ガス中蒸発法により作製を行った。

ナノサイズ化に伴い顕現する特異磁性とその起因に着目して、メスバウアー分光実験による特異物性の探索と計算機シミュレーション実験

による検証、磁性微粒子の磁気工学的応用研究の展開を図った。

(2) ナノ微粒子のゾウリムシの生存及び増殖に及ぼす影響

生体内には Fe 等の金属やそのイオンが様々な形で存在する。ここでは Fe イオンを含むフェライト系磁性微粒子（液相反応法）や金属微粒子（希ガス中蒸発法）を合成し、単細胞個体であるゾウリムシ等をプローブ細胞として (in vitro?, in vivo?) 組織反応性とバイオ応用への適応を調べた。

A 6. カーボンナノチューブならびにカーボンナノファイバーによるマクロファージならびにマウス脾臓細胞の活性化

CNT の細胞に対する刺激性を(1)単球系細胞株 (THP-1 細胞) の活性化、(2)マウス脾臓細胞の活性化、(3)TLR2 による認識を通して調べた。

A 7. カーボンナノチューブ・ファイバーの筋芽細胞ならびに骨芽細胞培養系における細胞増殖活性に及ぼす影響

マウス筋芽細胞 C2C12 細胞ならびにマウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の細胞培養系に、サイズ制御したカーボンナノチューブならびにナノファイバーを添加し、細胞増殖活性に与える影響について MTT 法により生細胞数を、BrdU を用いた ELISA 法により DNA 合成量を測定し検討した。

A 8. カーボンナノチューブの細胞に対する影響 - 細胞増殖と抗酸化機能に関して -

(1) 細胞増殖への影響

一般的な正常細胞であるヒト由来真皮繊維芽細胞 HF (p17) を用いて細胞増殖に対する影響を調べた。

(2) 抗酸化機能試験

フラブンの誘導体において活性酸素除去能が報告されている。カーボンナノチューブについても同様な機能があるか、あるいは逆に活性酸素生成があるか調べた。

A 9. カーボンナノファイバー/アルジネートコロイド：特性、生体適合性、バイオ応用

疎水性のカーボンナノチューブ、ナノファイバーに可溶化、分散させるために(1)カーボンナノファイバー/アルジネートコロイドの生成を行い、その生体為害性の有無について(2)ラット経口投与による血液成分の生化学的試験を行い、また(3)遺伝子導入用媒体への応用を行った。

A 10. カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用 - CNT の糖鎖・アパタイトによる表面修飾と吸着性 -

CNT のろ過膜や歯質等への固定化法や種々のバイオ機能を付与するための CNT の糖鎖およびアパタイトによる表面修飾を検討した。

(1) MWCNT の各種ろ過膜へ固定化

細胞培養担体として培養実験に使用可能な形態としてろ過膜上への固定化を試みた。

(2) 歯質への吸着固定化

エッチング処理した歯質スライスを MWCNT 分散液に浸漬し、CNT の吸着性を調べた。

(3) 糖鎖による表面修飾

バイオ応用展開を図るための MWCNT 表面への糖鎖修飾として、①ポリスチレン型人工糖質高分子、②ポリアクリルアミド型人工糖質高分子、③糖質系界面活性剤、④糖鎖結合型アルブミンの各糖鎖化合物を用いた表面修飾を行い、糖鎖認識に関する検討を行った。

(4) アパタイトによる表面修飾

生体親和性を付与するため MWCNT をカルシウムとリン酸のイオンを含む溶液へ浸漬し表面修飾を試みた。

A 11. カーボンナノチューブを用いた複合材料の作製と評価およびカーボンナノカプセルの生体為害性の調査に関する研究

(1) カーボンナノチューブ複合材料

高比強度の生体材料を合成することを目的として、カーボンナノチューブ (CNT) との繊維強化金属 (FRM) として放電プラズマ焼結 (SPS) により Ti/CNT を、繊維強化プラスチック

ク (FRP) として光重合によりアクリルレジ  
ン(BisGMA-TEGDMA)/CNT 複合材料を作製し、  
その強度を検討した。

#### (2)カーボンナノカプセルの生体内挙動

カーボンナノカプセルをバイオ応用するた  
めの基礎研究としてナノカプセルの生体内挙動の  
評価を行った。

### A 1 2. X-線を用いたナノクラスターキャラ クタリゼーション手法の開発研究

X線を用いたナノレベル分析手法として

(1)特定元素の原子周囲の構造情報の得られる  
EXAFS による合金ナノクラスター構造の原子  
レベル解析、

(2)エネルギー選別フィルターとして Wien  
filter を組み込み、高エネルギー分解能と空間分  
解能を有する光電子顕微鏡(EXPEEM)による  
ナノ領域の化学分析、

(3)波長可変 X 線を用いて、元素固有の結合  
エネルギーを持つ内殻電子を励起し原子間力を  
制御する、新しい顕微分光法の XANAM 法の  
開発を進めた。

### II-3. バイオマテリアル(バルク体)として のカーボンナノチューブの応用

カーボンナノチューブのふたつめの応用は微  
粒子の大量合成によるバルク集合体、焼結体の  
利用である。これはインプラント、人工臓器・  
組織代替用材料あるいは薬剤を体内で長期放出  
する徐放性インプラント等、マクロサイズのバ  
イオマテリアルとしての応用である。

通常、カーボンナノチューブは物理学的見地  
から単体としての性質が注目されることが多く、  
バルク体として生体応用の可能性を検討したも  
のはほとんど見当たらない。生体材料(マテリ  
アル)としての使用には被覆膜やバルク固体で  
ある必要がある。単体は原子数個大の中空状で  
あるから、これを固めることができればきわめ  
て軽量で強度の大きな材料になる可能性がある。  
しかし一般にカーボン材料は難焼結性であり、  
被覆膜やバルク固体を実現するために、大量合  
成法としてアーク放電を、焼結固化法として放  
電プラズマ焼結法を採用した。得られたカーボ

ンナノチューブ固化体についてその機械的特性  
と生体適合性を調べた。

カーボンナノチューブの生体適合性は材質的  
には C(炭素)であるから、ハイドロキシアパ  
タイトのような bioactive(生体活性)ではなく、  
アルミナ、ジルコニア等のような bioinert(生  
体不活性)と予想される。生体親和性を向上さ  
せるための表面処理としてチタンやアパタイト  
を被覆することも行った。

### A 1 3. 多層カーボンナノチューブの固化とハ イドロキシアパタイト被覆に関する研究

(1)カーボンナノチューブは密度が  $2\text{g/cm}^3$  以  
下と、軽く比強度が高いために、骨に類似した  
低密度と低ヤング率を持ち、かつ強度の大きい  
人工骨にできる可能性がある。一般にカーボン  
材料は難焼結性であるが、日本で開発された放  
電プラズマシステム(SPS)を用いて、単層と多  
層の 2 種類があるカーボンナノチューブのうち、  
耐熱性にすぐれた多層カーボンナノチューブ  
(MWCNT)の焼結固化バルク体を作製した。

(2)骨とのより積極的な親和性を付与するた  
めに、ナノチューブ固化体および金属チタンへの  
水熱合成法によるハイドロキシアパタイトの被  
覆を行った。生体適合性を改善するために  
 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  と 4 モルの  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  の混合原料  
の懸濁液を表面に塗布し、SPS にて  $1000^\circ\text{C}$  で  
加熱反応させ、ハイドロキシアパタイト被覆  
CNT 固化体を作製した。

### A 1 4. 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

(1)カーボンナノチューブ(CNT)固化体の特性  
評価

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。  
固化体として単層カーボンナノチューブ  
(SWCNTs)の合成反応時の生成物である未精  
製炭素、精製 SWCNTs、結合材としてフェノ  
ール樹脂を添加した SWCNTs の 3 種の焼結体

について比較した。

## (2) SWCNT 焼結体の最適作製条件

未精製焼結体では脆性破壊が生じ、結合材添加焼結体ではフェノールの生体為害性のため、ともに生体材料には適していない。生体適合性に優れたバイオマテリアルとして、精製 SWCNTs のみからなるバインダーレス SWCNT 焼結体を作製し、機械的特性に及ぼす焼結条件の影響を検討した。

## (3) カーボンナノチューブ(CNT)固化体および純 Ti へのハイドロキシアパタイトコーティング

既に Ca/P のモル比が HA の化学量論組成である 1.67 となるリン酸水素カルシウム二水和物 ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : DCPD) と水酸化カルシウム ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) の混和物に、水熱ホットプレス法を適用し HA/Ti 接合法を実現しているが、その接合形態は、円柱状アパタイト | Ti バルク体の底面同士の接合である。シリンダー状やより複雑な形状をしたインプラントとしての、Ti およびカーボンナノチューブ固化体周囲の全面コーティングを実現するために、水熱ホットプレス法中に二重カプセル法を導入し、擬似的に等方熱間プレス (HIP) を実現する方法を開発した。引抜試験により界面接着強さを評価した。

## A 1 5. ナノ微粒子の生体材料への応用に関する研究 *in vitro* および *in vivo* でのナノ微粒子への組織反応

多層カーボンナノチューブ(CNT)、カーボンナノファイバー(CNF)およびその焼結固化体の組織反応性を、(1)ラット皮下組織への埋入試験(*in vivo*)、および(2)細胞培養担体としてのカーボンナノチューブ吸着濾過膜上での骨芽細胞様細胞の細胞培養試験を行って調べた。

## A 1 6. 膜状電解質高分子のナノ構造制御による医療用アクチュエータへの応用

体内に挿入した際、体組織を傷つける可能性がある従来の医療用カテーテルに比べ、Nafion、ポリアクリロニトリル(PAN)ゲル等の含水性電気駆動型電解質高分子膜は材質が生体

組織に近く、心臓や四肢の柔軟な動きを模倣するポンプやヒトにやさしいアクチュエータ(人工筋肉)となり得る可能性があるが、応力緩和による発生力の低下のために持続性に問題があった。ここでは Nafion に代表される電界応答屈曲性を持つ膜状電解質性高分子を医療用アクチュエータとして用いる上での問題点：(i)低発生力、(ii)低耐久性、(iii)屈曲緩和、(iv)発生力緩和の改良克服、さらに印加電圧下における変形制御性の検討とその応用としてのポンプの試作を行った。

## B. 研究方法

### I. ナノ/マイクロ微粒子と生体適合性

#### B 1. 微粒子の生体適合性試験

##### (1) 試料

微粒子粉末として以下を取り上げた。  
金属：Ti, 表面窒化チタン(Ti(N)), Fe, Ni  
セラミックス：TiN,  $\text{TiO}_2$ , 可視光応答型光触媒二酸化チタン( $\text{TiO}_2/\text{Ag}, \text{Cu}$  ほか), NiO,  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , カーボンナノチューブ(カーボンナノファイバー(CNF)、単層カーボンナノチューブ(SWCNT)、多層カーボンナノチューブ(MWCNT))

チタンではマクロ大(1 x 5mm)の 99.9%Ti 棒(ニラコ)および 3  $\mu\text{m}$ (添川理化工業)、10  $\mu\text{m}$ (高純度化学研究所)、40  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ (住友メタル)大の Ti 微粒子をエチルアルコールで洗浄後、オートクレーブで 121 °C, 2atm, 20min 滅菌して用いた。他の微粒子についても同様な前処理を行って使用した。

##### (2) 粒度、濃度、比表面積の調整

粒子サイズを一定に揃え、材料(Ti, Fe, Ni,  $\text{TiO}_2$ )間の厳密な比較を可能にするために、粒度分布測定装置と比表面積測定装置でモニターしながら、粒度分布の異なる粒子群に沈降法を適用して 0.5, 3, 10  $\mu\text{m}$  粒子を、また限外濾過法を適用して 300nm 以下の粒子をそれぞれ抽出した。各材料間の比較には濃度、粒子数、比表面積をそれぞれ同一に揃えて行った。

##### (3) 形状依存性

形状依存性を調べるために、形状異方性の小さい不定形(以下、塊状と記述)およびアスペクト比の大きい針状の、それぞれ平均径、長径が0.5, 3, 10  $\mu\text{m}$  でほぼ同等な  $\text{TiO}_2$  微粒子を抽出し、細胞機能性に及ぼす形状効果を比較した。

#### (4)溶出試験

チタン微粒子を pH7.4 に調整した HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)溶液に  $37^\circ\text{C}$ , 1ヶ月浸漬後、ICP(日立 P-4010)元素分析を行なった。検出された Ti が溶出イオンかチタン微粒子自体なのかを区別するために、混和液を遠心分離後、上澄み液(濾過前)と、さらに  $0.45\ \mu\text{m}$  のメンブレンフィルター濾過後とを分析し比較した。

#### (5)細胞機能性試験

健常者から採取したヒト好中球、ヒト歯根膜由来線維芽細胞およびラット腹腔・肺胞マクロファージを使用し、細胞生存率、増殖率、LDH(Lactate Dehydrogenase)産生量、チトクローム C還元法による活性酸素産生能、および ELISA kit(Endogen)を用いた (TNF-a, IL-1b, IL-8, GM-CSF)産生量の測定を行った。また好中球をチタン微粒子混和液に添加、 $37^\circ\text{C}$ , 1hr 保持した後、固定、脱水、臨界点乾燥、蒸着し、好中球の形態変化を SEM(日立 S-4300)による観察およびエネルギー分散型 X線元素分析(EDS)による元素分析を行った。細胞としてはほかにラットマクロファージ、ヒト歯肉線維芽細胞も用いた。

#### (6)動物埋入試験

ウイスター系雄性ラット腹部皮下にチタン棒、微粒子を埋入し、1-30週後に、また長期症例としては1年および1年6ヶ月後に、周辺組織を摘出し、通法によりパラフィン包埋後、薄膜切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡により組織観察を行った。

## B2. 耐摩耗性窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの開発

### (1)試料作製

窒化チタン粉末(ニラコ、粒径  $45\ \mu\text{m}$  以下)および  $1150^\circ\text{C}$  で焼結後粉碎して得られた

HAP 粉末(住友大阪セメント、粒径  $40\ \mu\text{m}$  以下)を種々の割合に配合し、順次濃度勾配がつくように  $20 \times 50\text{mm}$  の高強度グラファイトモールドに高さ方向に積層充填し、放電プラズマ焼結装置 (SPS-2040、住友石炭鉱業)を用い、 $1100, 1200^\circ\text{C}$ 、圧力  $150\text{MPa}$  で焼結した。組成傾斜方向が最長軸となるようにダイヤモンドディスクにて所定サイズの角柱状試料片を切り出し、一端が TiN100%、他端が HAP100%の組成傾斜試料(以下 TiN/HAP と略す)とした。

### (2)観察・分析

TiN/HAP を走査型電子顕微鏡 (SEM:日立 S-2380N)にて観察し、電子プローブマイクロアナライザ (EPMA:JEOL JXA-8900M)、X線分析顕微鏡 (XSAM:堀場 XGT2000V)、ラマン分光測定装置 (Dilor-Jobin Yvon-Spex-Horiba LABRAM)により分析を行った。

(3)機械的試験 組成傾斜方向の硬さの変化を調べるために直径  $1.5\text{mm}$  の鋼球圧子を荷重  $10\text{kgf}$ 、荷重保持時間  $30\text{sec}$  の条件下で圧入し、マイクロブリネル硬さ試験 (森試験機 5859)を行った。傾斜材料の各部位について3箇所測定し、平均値を求めた。また万能試験機 (Instron4204)を用いて、3点曲げ試験 ( $2 \times 2 \times 10\text{mm}$ )と圧縮試験 ( $3 \times 3 \times 6\text{mm}$ )を行った。

(4)動物埋入試験 生後14週齢、体重  $380\text{--}400\text{g}$  の雄性のウイスター系ラットを用い、全身麻酔下で大腿骨骨髓腔内に試料 ( $1 \times 1 \times 6\text{mm}$ )を埋入し、2週後に摘出した。摘出した大腿骨を通法に従い、固定、染色、包埋、加工して非脱灰研磨標本を作製して病理学的検索を行った。

## II. バイオ用カーボンナノチューブの開発

### (1)合成

アーク放電法により、Fe/Ni、Ce等種々の触媒金属を用いて単層/多層カーボンナノチューブの大量合成を行った。また市販の多層ナノチューブ(NanoLab)も購入し、原素材とした。

### (2)精製高純度化

得られた合成物にはアモルファスカーボン、金属触媒が混在し、純度、カーボンナノチューブの含有率は高くない。加熱焼却によりアモルファスカーボンを除去し、酸処理溶解により触媒の Ni, Fe を除去し、精製高純度化を図った。

### (3)表面修飾—可溶分散化・単離、切断

疎水性で凝集しやすいナノチューブのイオン基付加による可溶・単離・分散化を行った。またバイオ応用には長径が大きすぎるので、剪断加工・強酸化学処理による切断・サイズ制御を試みた。

また遺伝子、蛋白質、糖鎖チップの微粒子への吸着、結合、付加等を実現するために、分子結合を可能とする表面修飾を行った。

(4)試料の合成、形状、単離の確認に高分解能電子顕微鏡観察を行った。また高エネルギー物理学研究機構放射光実験施設 BL9A を用い、EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) および EXPEEM (energy filtered X-ray photoemission electron microscopy) の実験を行った。

(5)生体反応性については種々の細胞機能性試験、細胞認識・サイトカイン放出機序の解析、骨芽細胞培養に及ぼす影響解析、細胞への遺伝子導入および単体/集塊のラット皮下への動物埋入試験を行い、光学顕微鏡、SEM 観察を行った。

B 4. バイオ応用を目指した水溶化カーボンナノチューブ・ナノファイバーのサイズ制御、及び磁性ナノ粒子に関する研究

### (1)バイオ応用のためのカーボンナノチューブ・ナノファイバーの可溶化とサイズ制御

強酸化剤である硫酸と硝酸の混合液中にナノチューブ・ナノファイバーを入れ、超音波照射することにより、CNTs, CNFs の切断、水溶化を可能にした。遠心分離後、上澄み液を様々なサイズのメンブランフィルターを用いて濾過し、サイズの揃ったナノチューブ・ナノファイバーを分離した。表面改質には湿式オゾン処理を用いて行い、CNTs に付加された置換基は FT-IR で調べた。

### (2)精製高純度化

湿式粉碎、湿式酸化、水熱処理、遠心分離、燃焼酸化などの処理を組み合わせることにより、アモルファスカーボン、グラファイトカプセル、グラファイト、触媒金属を除去し精製高純度化することが可能となった。

B 5. ナノ微粒子の生成・物性および生体に与える電磁気的影響

### (1)ナノ磁性微粒子の生成と特性評価

### (2)ナノ微粒子のゾウリムシの生存及び増殖に及ぼす影響

単細胞個体であるゾウリムシを対象に、液相反応法で作製したフェライト系磁性微粒子、希ガス中蒸発法による金属微粒子および CNT に対する細胞機能性試験を行った。試験には約 8 時間おきに分裂するゾウリムシの細胞増殖能力を評価するのに適した枯草菌を含む培養液と、細胞分裂が停止し分裂停止期の細胞のモデルになる生理食塩水の 2 種類を用いて行った。

B 6. カーボンナノチューブならびにカーボンナノファイバーによるマクロファージならびにマウス脾臓細胞の活性化

### (1)単球系細胞株 (THP-1 細胞) の活性化

ヒトマクロファージ系細胞株 THP-1 細胞からの TNF- $\alpha$  産生量を ELISA 法で測定した。

### (2)マウス脾臓細胞の活性化

生体防御において中心的な役割を果たしている免疫系に及ぼす影響を調べるために、C57BL/6 マウス脾臓細胞における RT-PCR 法を用いた TNF- $\alpha$  の mRNA の発現を調べた。

### (3)TLR2 による認識

CNT の細胞に対する刺激性を調べるために、ヒトマクロファージ系細胞株 THP-1 細胞から、TLR2 遺伝子を RT-PCR 法により pEF6/V5-His TOPO ベクターにクローニングし、NF- $\kappa$ B 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (pNF- $\kappa$ B luciferase reporter plasmid) とともに human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に遺伝子導入し、可溶化 CNT および CNF 懸濁液ならびに 10 倍希釈液で刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

B 8. カーボンナノチューブの細胞に対する影響 –細胞増殖と抗酸化機能に関して–

(1)カーボンナノチューブの細胞に対する影響 –細胞増殖–

ヒト由来真皮繊維芽細胞 HF (p17) を用い、アルギン酸によって分散され可溶化された CNT (可溶化 CNT) に対する 1、2、7 日目の細胞生存率を MTS 法により測定した。

(2)カーボンナノチューブの細胞に対する影響 –抗酸化機能に関して–

可溶化 CNT 及び可溶化処理を施していない超音波分散 CNT について、Abel antioxidant Kit を用いて活性酸素除去能力を測定した。

B 9. カーボンナノファイバー/アルジネートコロイド：特性、生体適合性、バイオ応用

(1)カーボンナノファイバー/アルジネートコロイドの生成

アルギン酸ナトリウム水溶液中でカーボンナノファイバーを分散することによって、親水性カーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウム (CNFs/Na-ALG) コロイドを作製した。コロイドの親水性領域の情報を SEM、TEM 観察、ゼータポテンシャル分析、スペクトル測定により得た。

(2)ラット経口投与試験

CNFs/Na-ALG コロイドを内包したアルギン酸塩球状中空カプセル内をラットへ経口投与し、血液成分の生化学的試験を行った。

(3)遺伝子導入用媒体への応用

CNFs/Na-ALG 複合体に pCMV b-Gal 発現プラスミドを結合し、H1299 肺ガン細胞株への遺伝子導入を試みた。

B 10. カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用 – CNT の糖鎖・アパタイトによる表面修飾と吸着性 –

(1)MWCNT の各種ろ過膜へ固定化

MWCNT を超音波処理分散後、吸引濾過し、PTFE 膜 (Polytetrafluoroethylene、孔径 1.0mm) および PC 膜 (Polycarbonate、孔径 0.8mm) 上に固定化を行った。

(2)歯質への吸着固定化

エッチング処理した歯質スライスを MWCNT 分散液に浸漬し、吸着性を調べた。

(3)糖鎖による表面修飾

糖鎖化合物として①ポリスチレン型人工糖質高分子、②ポリアクリルアミド型人工糖質高分子、③糖質系界面活性剤、④糖鎖結合型アルブミンを用い、表面修飾および糖鎖認識に関する検討を行った。

(4)アパタイトによる表面修飾

生体親和性を付与するため MWCNT をカルシウムとリン酸のイオンを含む溶液へ浸し静置した。

B 11. カーボンナノチューブを用いた複合材料の作製と評価およびカーボンナノカプセルの生体為害性の調査に関する研究

(1)CNT 含有複合材料

放電プラズマ焼結 (SPS) により Ti-CNT 複合体を、光重合により作製したアクリルレジ (BisGMA-TEGDMA) – CNT 複合体を作製し、その強度を検討した。

(2)ナノカプセルの生体内挙動

Ce 含有カーボンナノカプセル (Ce-CNC) をラット尾静脈より投与し、屠殺後、摘出した臓器を加熱灰化し、ICP にて臓器への蓄積挙動を調査した。またラットの肺胞、腹腔マクロファージ及び THP-1 細胞に投与して培養し、TNF-a 及び IL1-b の産生量から Ce-CNC の為害性を評価した。

III. カーボンナノチューブ焼結バルク体の作製とその特性

(1)作製

精製した多層ナノチューブおよびナノファイバーを放電プラズマシステム (SPS) により焼結しバルク体を作製した。

また材質的には C (炭素) であり、生体適合性は bioinert (生体不活性) と予想されるカーボンナノチューブに bioactive (生体活性) な特性を付与するために、固化カーボンナノチューブ表面に電子ビーム蒸着法によりチタン金属を被覆し、その上にさらにハイドロキシアパタイトの被覆を試みた。

## (2)特性解析

カーボンナノチューブ焼結固化体の力学的特性評価のために、小型円盤状試験片(10x1mm)を用いたスモールパンチ (SP) 試験を行い、荷重-変位曲線から破壊強度、破壊エネルギーを評価した。また同時にアコースティックエミッションも測定し、試料内部での破壊機構の解析を行った。

## (3)生体適合性試験

単体/集塊のラット皮下への動物埋入試験を行い、光学顕微鏡による病理学的検索、SEM 観察を行った。

## B 1 3. 多層カーボンナノチューブの固化とハイドロキシアパタイト被覆に関する研究

### 5. CNT 焼結バルク体の作製

#### (1)多層カーボンナノチューブの固化

CNT の焼結固化バルク体は軽量不活性で機械的性質に優れると期待されるが、難焼結性である。耐熱性にすぐれた MWCNT に対して結合材としてフェノール樹脂あるいはポリカルボシランを添加し、放電プラズマ焼結(SPS)で 1000 ~ 1600 °C で焼結を行った。3 点曲げ試験により固化体の破壊挙動を調べた。

#### (2)ハイドロキシアパタイト被覆

固化カーボンナノチューブは生体不活性であり、生体活性にするために、水熱合成法で使われている 6 モルの CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O と 4 モルの Ca(OH)<sub>2</sub> との懸濁液に固化カーボンナノチューブを浸漬し、表面に懸濁液を塗布した後、SPS で加圧・加熱することでハイドロキシアパタイト被膜を形成した。同様に Ti 金属上への被覆も行った。

## B 1 4. 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

触媒として Fe/Ni 金属を用いてアーク放電法により合成したままの未精製のカーボン煤、これを精製して得られた単層カーボンナノチューブ(Single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) および結合材としてフェノール樹脂を 50mass%混合した SWCNTs の 3 種類の出発原

料を用意し、放電プラズマ焼結法 (spark plasma sintering, SPS) により焼結固化体を作製した。

機械的特性の評価には、スモールパンチ (SP) 試験法を用い、SWCNT 焼結体の縦弾性係数および最大荷重までの仕事量の測定を行った。また、精製法の有効性およびプラズマ焼結による SWCNTs の構造変化の可能性をラマン散乱測定を用いて評価した。

## B 1 5. ナノ微粒子の生体材料への応用に関する研究 *in vitro* および *in vivo* でのナノ微粒子への組織反応

### 1) *in vivo* 実験用試料

(1) カーボンナノファイバー(CNF)  
(2) 多層カーボンナノチューブ(CNT)  
(3) CNT-HAp : CNT を放電プラズマ焼結法 (SPS 法) を用いて、120MPa, 120 °C、Phenol resin30%を添加して SPS で焼結した CNT 固化体に PVD 法で Ti コーティングを施した後、さらに水熱ホットプレスにより HAp コーティングした試料を骨内埋入用試料とした。

(4) 結合材を含まない固化体および phenol resin を結合材として用いた CNT 固化体

直径 20-50nm、長さ 5μm 以下の多層 CNT に重量比で、0%、25%、50%の phenol resin を混合し、焼結圧 80MPa、焼結温度 1000 °C の条件で SPS 装置にて焼結し、1×1×5mm に調整した。

(5) polycarbosilane を結合材として用いた CNT 固化体

5%、15%、25%の polycarbosilane を混合し、焼結圧 120MPa、焼結温度 1200 °C の条件で SPS 装置にて焼結した。

### 2) *in vitro* 用試料

NanoLab 社製 CNT を蒸留水に懸濁し、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)およびポリカーボネート(PC)膜で吸引濾過することにより、CNT を PTFE および PC に付着させた (CNT+PTFE 膜, CNT+PC 膜)。

## (倫理面への配慮)

*in vitro* 試験用の細胞は代表的なものについて



て市販のものを購入、ヒト好中球、ヒト歯根膜由来線維芽細胞を用いた研究は実験に先立ち、北海道大学大学院歯学研究科・歯学部倫理委員会の承認を得て行った。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

### I. ナノ/マイクロ微粒子と生体適合性

#### C1. 微粒子と生体反応

##### (1)微粒子と生体組織反応(in vivo)

種々の Ti 微粒子に対して動物埋入試験を行うと、150  $\mu$  m Ti 粒子では各粒子が線維性結合組織で周囲を覆われ、炎症性細胞はほとんど認められず、インプラントに使われる巨視的サイズの棒状 Ti と同様な生体適合性を示した。50  $\mu$  m 粒子では各粒子が結合組織で周囲を覆われるが、炎症性細胞も現れた。10  $\mu$  m 粒子では粒子群内部に結合組織と炎症性細胞浸潤が形成された。3  $\mu$  m 粒子では粒子間には結合組織は形成されず、粒子が巨食細胞によって貪食され、やがて粒子群全体をおおうように結合組織が形成され、長期間炎症性反応が継続した。

図1は3  $\mu$  m Ti 微粒子を埋入したラット軟組織の経時的変化を示したもので、1週間、30週間の様子である。はじめ分散していた微粒子は埋入期間の経過とともに、次第に凝集してくる傾向を示す。

図2は図1に見られる現象を説明する機構として、Ti 微粒子に対する組織反応の一つの可能性を示した模式図である。

微粒子に細胞・組織が接触すると、好中球が誘因され貪食により微粒子の局所的な凝集をもたらした後、細胞死に至る。このときサイトカインを放出して巨食細胞の分化・誘導、誘引を促し、さらに貪食作用とその結果としての微粒子の凝集を継続するとともに、周囲に線維性結合組織の形成を促す。これらの複合した作用の結果、微粒子群は時間の経過とともに次第に凝集する。

##### (2)微粒子と細胞反応(in vitro)

ヒト好中球、歯根膜細胞、ラットマクロファージを用いた細胞機能性試験では、Ti, Fe, Ni(各 500nm; 3, 10, 50, 150  $\mu$  m), TiO<sub>2</sub>(30, 60, 300, 500nm; 2  $\mu$  m), ポリ乳酸(1, 13  $\mu$  m)の微粒子径が小さくなるほど細胞生存率が低下し、LDH、活性酸素、サイトカイン TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, M-CSF の放出は増大し、ナノ領域でも継続した。特に細胞より小さな10  $\mu$  m 以下では貪食を誘発し著しく増大した。その刺激性は細胞内毒素に比べると1/100 ~ 1/1000 程度オーダーが低い。

以上の条件下で Ti 微粒子からの溶出量の ICP 元素分析を行うと検出限界値以下であり、イオン溶出は無視できると考えられる。

これらの液中での好中球の形態を観察すると、3  $\mu$  m 以下の粒子でのみ好中球による貪食像が観察された。好中球の大きさは約5 ~ 10  $\mu$  m であり、3  $\mu$  m 粒子は貪食可能であるが、10  $\mu$  m 以上の粒子では不可能と考えられる。3  $\mu$  m 以下の粒子で発現する TNF- $\alpha$  の急激な放出増大は好中球の貪食作用に非常によく対応しており、貪食作用に伴い放出されるものと考えられる。

図3は細胞機能性試験の指標の1例としてヒト好中球からの活性酸素の産生量を各種サイズの微粒子に対して示したものである。Ti 微粒子の3  $\mu$  m 付近から以下で、粒径の減少とともに産生量が増大し、TiO<sub>2</sub>における nm 領域でも増加していることがわかる。こうしたサイズ依存性効果は10  $\mu$  m 付近から10nm にかけての領域で顕著に現れる。

CNT の場合にはコントロールに比べ刺激性はあるものの、サイズ依存性は見掛け上、他の微粒子と逆の相関を示している。カーボンナノチューブ(CNT: 30, 200nm; 1, 2  $\mu$  m)、ナノファイバー(CNF: 2  $\mu$  m)では細胞刺激性を示すが、10  $\mu$  m から10nm 領域にかけ、サイズが減少するほど諸指標が減少する逆相関を示した。

##### (3)ナノ・マイクロ微粒子の生体材料への応用

に関する研究—ナノ・マイクロ微粒子に対する *in vitro* および *in vivo* での細胞・組織反応—  
カーボンナノ粒子の生体親和性

#### ① CNT

CNT を播種したシャーレ上でヒト線維芽細胞を培養した場合、細胞の生着が早く、増殖および伸展は微粒子の影響を受けた。CNT 表面に細胞突起の伸長が認められた。また、トリプシン処理を行っても剥離されない細胞が多数認められた。細胞外基質との結合や、細胞膜との嵌合が示唆される。

*in vitro* の実験では炎症性サイトカインの放出を認めたが、細胞障害性を示す結果はなく、細胞に対する為害作用は比較的低いものであった。

皮下埋入試験からは強い炎症反応を引き起こすものではなかった。

#### ② CNF

ラットマクロファージとヒト歯根膜細胞の生存率はコントロールと比較して有意差を認めなかった。LDH 流出量も有意差がなく、CNF は細胞に対して致命的な影響はないことが確認できた。220, 550, 670nm の CNF は細胞が反応するサイズであることが確認され、220nm の粒子では反応が小さくなっていた。

埋入後 3 日で、CNF 粒子周囲には血管の拡張や浮腫が生じ、多数のマクロファージや異物巨細胞が認められた。好中球の浸潤は比較的早期に見られるが強い炎症反応による壊死は観察されなかった。1 週間後 CNF の粒子の多くは、集塊を作り、大きさは数十ミクロンのものが多く認められた。4 週後、基質化は進み、CNF 粒子の集塊は菲薄な線維性結合組織に被包され、間葉系の細胞や異物巨細胞が多数観察された。

### C 2. 耐摩耗性窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの開発

図 4 にデンタルインプラント（人工歯根）の概念を模式図として示した。人工歯根は怪我、老齢化、その他で歯牙を喪失した場合に顎骨に植立する。顎骨内に埋入された下方歯根部のインプラント表面に直接接触するように新生骨が形成され、インプラントは固定される。顎骨、

粘膜を貫通し、口腔内に露出した上部の支台部には歯冠部に相当する上部構造が適合し、咬合・咀嚼機能を人工的に回復する。咬合力として 60kgf 程度負荷される。

人工歯根は骨内から骨外へ貫通する構造のため、顎骨内埋入部、顎骨外（口腔内）およびそれらの境界部は果たすべき機能と要求される特性が異なっている。しかし現在用いられている多くは先端から基部まで長さ方向に同一構造、同一材料で構成されている。

この問題に対して各部位での機能性をより最適化した構造にするために傾斜機能材料 (Functionally Graded Materials:FGM) の概念を導入することを考えた。繰り返し応力が直接負荷されるインプラント上部では強度特性を重視して金属の中で最も生体親和性にすぐれたチタン (Ti) を、骨内に埋入される下部にはより生体親和性や骨誘導性を重視し (bioactive)、骨や歯質など硬組織の主成分であるハイドロキシアパタイト (HAP) を多く配合した傾斜機能型人工歯根の作製を試みた。

以下、一端を純 TiN とし、長さ方向に濃度傾斜し、他端を HAP 高濃度含有材 (例えば TiN-20wt % HAP) となるような試料を TiN/20HAP のように表記する。

図 5 は SPS 焼結温度 850 ° C で作製した Ti/HAP および 1200 ° C で作製した TiN/HAP 傾斜機能型インプラントである。デンタルインプラント型の形状にはなっていないが、左から右端へ 10% ずつ 11 段階で HAP 含有量を徐々に増加させ、口腔内に位置する左方部は機械的特性を重視して Ti または TiN を多く、顎骨内に埋入される右方部は新生骨の形成を促すためにアパタイト濃度を多く配し、最右部で純アパタイトとなるようにして骨親和性を重視する構造となっている。また機械的特性も平均ヤング率を徐々に低下させ、骨の物性値により接近させ過重な負荷を顎骨にかけないことを狙った応力緩和型にもなっている。

図 6 は Ti/HAP(焼結温度 850 ° C) および TiN/HAP(1100, 1200 ° C) 傾斜機能型インプラントの各部位におけるブリネル硬さを示したものである。Ti/HAP では左の Ti から右の HAP

方向に硬さが傾斜的に減少しており、傾向としては応力緩和的に働く方向にある。TiN/HAPではブリネル硬さ 60 程度で全体がほぼ一定である。本来の TiN の硬さはもっと高いはずであるが、TiN 側が焼結不十分なためである。

図7はラット大腿骨骨髓腔内に8週埋入後のTiN/HAPインプラント周囲のEPMA元素マッピング像で、試料の染色は行っていない。TiとHAPの代表元素としてのカルシウム(Ca)の分布を表示している。TiN/HAPインプラントはまず高さ方向に濃度傾斜したより大型(20φ x12mm)の傾斜材を放電プラズマ焼結法で作製し、これから長さ方向に濃度傾斜するように1x1x12mmの角柱状に切り出して作製した。インプラント材内部においてはTi濃度は左から右方向に行くほど減少しているのに対し、Ca濃度は逆にTiとは相補的に次第に増加し、最右部で最強になっており、純TiNから純HAPへの濃度傾斜構造が確認できる。またCa像からインプラント周囲には埋入8週を経過した後、新生骨がインプラント全周をおおように形成されていることがわかる。

図8は図7のTi/100HAPインプラントのTiN, HAP高濃度部近傍に形成された新生骨を拡大した光学顕微鏡透過像である。インプラント材料内部はTiN高濃度部では不透明であるが、HAP高濃度部では半透明なHAPマトリックス中にTiN粒子が散在して焼結されているのがわかる。新生骨形成はTiもHAPもともに生体親和性に富む材料であるために部位による大きな違いは顕著ではないが、HAP含有量が高いほど埋入早期からインプラント材料表面に直接接触するように新生骨形成が進行する傾向が見られる。埋入8週ではTiN高濃度部では骨量は多いが、比較的うねりの大きい外表面形態を示し、骨内には強く染色された細胞核が斑点状に多数見られ、幼若な新生骨の特徴を示している。一方、HAP高濃度部では新生骨はインプラント材料表面に密着し、その骨量はむしろ減少し菲薄化している。新生骨外表面の形態は平滑であり、骨内部には細胞核は少なく、より成熟化が進行していることが認められる。

## II. 微粒子のバイオ応用

### C3. 乳化溶媒蒸発法によるマイクロパーティクル形成

PLGAを溶媒に溶解し、ホモジナイザーによって攪拌することでエマルジョンを作製し、シングルエマルジョン、ダブルエマルジョン中の溶媒の蒸発消失によるポリマーの析出により、単一中空構造から多数の中空球を内包する、サイズ1~100μmの球状微粒子を作製した。光学顕微鏡下のその場観察により、初期の微小液滴から最終的な微小固体粒子に至る粒子形成過程を明らかにした。

#### II-1. バイオ用カーボンナノチューブの開発

#### II-2. 微粒子、カーボンナノチューブ単体のバイオ応用

### C4. バイオ応用を目指した水溶化カーボンナノチューブ・ナノファイバーのサイズ制御、及び磁性ナノ粒子に関する研究

#### 1. バイオ用カーボンナノチューブ(CNT)、ナノファイバー(CNF)の開発

##### (1) バイオ用カーボンナノチューブ・ナノファイバーの可溶化とサイズ制御

糸まり状のCNTを強酸中で超音波照射して切断後、遠心分離とフィルター分離を併用しナノチューブのサイズ分離を行った。ポアサイズ1.2、0.8、0.4mmのPCメンブランフィルターで順次ろ過し、平均長670nm、540nm、220nmの長さを持つナノチューブの分離に成功した。赤外吸収スペクトルで、水酸基が付加したグラフィンとカルボキシル基の親水基ピークが検出され、サイズ調整した可溶性ナノチューブの作製が可能となった。湿式オゾン処理により、ナノチューブ表面にエポキシド結合を導入し、表面改質を行った。オゾン処理の際に、ナノチューブの置換基が減少する傾向が見られたが、これはオゾン酸化による置換基の分解によって起こった現象と考えられ、ナノチューブの表面を綺麗にする効果もあると推測される。

##### (2) バイオ用カーボンナノファイバーの開発

コーン状グラフィンを重ねた構造を持つ繊維状のCNFsはコーンの端にグラフィンのエッジが存在するため、多くの親水基や特異的な官

能基を付加することができる。また、それぞれのコーンは結合力の弱いファンデルワールス結合であり、コーンを切り離すことによって CNFs を切断し、CNFs のサイズを制御することも可能である。

CNFs の親水化向上のため、濃硫酸と濃硝酸の混液中で CNFs のエッジを酸化し、水酸基、カルボキシル基を付加させることで、水溶性 CNFs を調製した。同時に強酸中の超音波照射を行うことによって CNFs を切断した。切断された CNFs の長さは 2 時間、4 時間、6 時間の超音波処理に対して、1.5 mm、800 nm、400 nm と短くなり、超音波照射時間によって長さ制御が可能になった。

2. 酸化物磁性ナノ粒子の合成と医療応用の検討—センチネルリンパ節検出法への磁性ナノ粒子の適応の検討—

医療応用に用いるための磁性ナノ粒子を合成することを目的とした。共沈法によりマグネタイト粒子径を制御した。また、粒子径、粒度分布を制御したコバルトフェライトを酸化法により合成した。また、金属磁性ナノ粒子の医療応用検討のためポリオールを用いて粒子径を制御したコバルト粒子を合成した。

病巣から最初に転移が起こるとされるリンパ節のセンチネルリンパ節の検出に磁性ナノ粒子を用いることを試みた。共沈法合成マグネタイトをセンチネルリンパ節検出剤として用いた。

C 5. ナノ微粒子の生成・物性および生体に与える電磁気的影響

(1) ナノ磁性微粒子の生成と特性評価

① 金属系微粒子については真空蒸着装置を改良した希ガス中蒸発法、酸化物系微粒子については液相反応法を用い、種々の物質の微粒子を作製した。

② また磁性微粒子の結晶構造や磁気特性を検討し、ナノ粒子構造の「表面磁気異方性の誘起」に起因する特異磁性（飽和磁化値・保磁力値等）の顕現を計算機シミュレーションにより確認した。

③ 六方晶系 Mn 置換 Ba フェライト及び La-Co 置換 Sr フェライトのナノ微粒子を作製

し、格子歪導入に伴う歪磁気異方性と単磁区粒子臨界径の増大効果により高保磁力化を達成した。

(2) ナノ微粒子のゾウリムシの生存及び増殖に及ぼす影響

① 食胞形成能に対する影響

ゾウリムシ細胞内への CNT の取込み量を、細胞口から取込まれた粒子性物質を濃縮し膜で包んだ食胞の形成数で評価し、経時変化を測定した。CNT も  $\text{TiO}_2$  も食胞形成能力は 3 日間までなら阻害されることなく高いレベルにあることがわかった。

② 分裂停止期 (post-mitotic cell cycle) の細胞に対する影響

分裂停止期の細胞に対して  $\text{NiO}$  と  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  の場合には濃度が高くなるほど時間とともに生存率は低下した。希釈シリーズの溶液を作り、各濃度における生存率を調べた結果、生存率 50% 濃度は  $\text{NiO}$  と  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  ではおよそ  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  付近に認められた。CNT では、最大濃度の  $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  でも 3 日間で 100% の生存率を示した。

③ 細胞増殖に対する影響

$\text{NiO}$  および  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  は共に強い増殖阻害効果を示し、濃度増加とともに増殖率 0 程度まで抑制する。CNT でも増殖阻害効果はあるが、コントロール比 40% 付近で安定化し、それ以上の阻害効果は示さなかった。その後、処理した細胞群を CNT を含まない新鮮な培養液に移して増殖能力を調べた結果、どの処理群でもコントロールレベルまで回復した。

C 6. カーボンナノチューブならびにカーボンナノファイバーによるマクロファージならびにマウス脾臓細胞の活性化

カーボンナノチューブ、カーボンナノファイバーはヒト由来マクロファージ系細胞株 THP-1 細胞を活性化し、 $\text{TNF-}\alpha$  産生を誘導したが、そのレベルは微生物由来リポペプチド FSL-1 の 2000 分の 1 以下であり、非常に低く、TLR2 を介しての  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  の活性化能は有していなかった。またマウス脾臓細胞を活性化し、 $\text{TNF-}\alpha$  の mRNA の発現を誘導する活性を有し