

ていたが、その活性は微生物由来リポペプチドならびにリポ多糖体に比べて非常に弱かった。

C7. 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 細胞における DNA 合成量ならびに生細胞数は 670nmMWCNT に対しては無添加のコントロールと比べて有意差は認められなかったが、550nm, 220nm とサイズが減少するとともに、有意に増加した。しかし、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞においては細胞増殖活性に対する影響は見られなかった。ナノチューブはサイズに依存して細胞の増殖活性に対して影響を与え、細胞特異性があることが明らかとなった。

こうした細胞内シグナル伝達機構を活性化し、細胞増殖に影響を及ぼす作用機序の可能性として、微粒子の細胞に対する物理的な刺激性、大きさの小さい不溶性分子を非自己すなわち異物として認識し、細胞内に取り込むエンドサートーシスが挙げられ、物理的な刺激に対する受容機構の細胞特異性が細胞に依存する反応性の違いをもたらした可能性が考えられる。

C8. 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) は CNT (可溶化 CNT) に対して、培養 7 日目までコントロールと同様の増殖及び生存を示した。CNT による影響は全く観察されず、可溶化 CNT は細胞増殖促進能、障害能のどちらも有していなかった。

(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 の両方とも、抗酸化作用は検出されなかった。超音波で分散化した CNT においては逆に活性酸素生成能をもつ可能性も否定できない。

C9. 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

アルギン酸は食品にも含まれておりバイオ応用に適している。カーボンナノファイバーをアルギン酸ナトリウム水溶液中で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) コロイドを再現性良く得ることができた。ゼータポテンシャル解析から、全 pH 領域にわたってアルジネートは CNF 上へ吸着し、カルボキシル基同士の電氣的反発力がファン・デル・ワールス力による凝集を妨げ、コロイドを安定化させることがわかった。

(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が、急性毒性症状等は観察されず、為害性は認められなかった。

(3)遺伝子導入への応用

CNFs/Na-ALG 複合体に pCMV b-Gal 発現プラスミドを結合し、H1299 肺ガン細胞株への輸送に応用した。

C10. 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 を分散溶液とし、吸引ろ過装置を用いることにより、各種ろ過膜へ固定化を達成できた。

(2)歯質への吸着固定化

エッチング処理した歯質に対し、エナメル質には吸着されないのに対し、象牙質にはコラーゲンとの疎水的な相互作用により選択的に吸着された。

(3)糖鎖による表面修飾

糖鎖機能を付与するため、MWCNT に対して人工糖質高分子を混ぜると、人工糖質高分子は MWCNT 表面へ密に吸着し、表面修飾が容

易に達成できた。蛍光ラベル化したラクトース側鎖型ポリスチレンを多層カーボンナノチューブ(MWCNT)分散液に加えると、繊維状形態に沿って蛍光が観察され、表面への糖鎖の吸着が確認され、レクチンとも選択的に結合した。

①ポリスチレン型人工糖質高分子

表面は密に糖鎖で覆われ、糖鎖は相当するレクチンにより選択的に認識された。ビオチンラベル化した場合もアビジンにより選択的に認識された。

②ポリアクリルアミド型人工糖質高分子、および③糖質系界面活性剤

レクチンによる選択的な認識は起こらず、非特異的な吸着をした。

④糖鎖結合型アルブミン

単独ではレクチンによる選択的な認識は起こらず、BSAを共存させることにより選択的認識を発現した。

(4)アパタイトによる表面修飾

カルシウムとリン酸のイオンを含む溶液へ浸漬し静置すると、MWCNTをコアとした結晶物が析出し、容易に表面修飾が可能であることが分かった。擬似唾液に分散させたMWCNTでは表面からアパタイト結晶が放射状に析出した。

C11. 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)で作製したTi-CNT複合体ではTiがCNTと反応してTiCを生成し強化に寄与しなかった。光重合により作製したアクリルレジン-CNT複合材料の場合には曲げ弾性率がやや向上し、強化の可能性が示された。

(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)投与後の臓器への蓄積については、血液中でCe濃度が最も高く存在し、一部の臓器(肺、心臓、腎臓)にもやや認められた。またラットの肺胞、腹腔マクロファージ及びTHP-1細胞に対するCe-CNCの細胞刺激性はチタン微粉末と同程

度であり、為害性が十分に低いことが示唆された。

C12. 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

(1)EXAFS法によるナノチューブ中の金属触媒の構造解析

合金ナノクラスターの構造を原子レベルで調べることができるEXAFSにより、PtPdナノクラスターはCluster-in-cluster構造、CuPdナノクラスターはheterobondphilic構造であることを見出した。

(2)EXPEEM法の開発

放射光を用いてAu/Ta試料に対する空間分解能1-2mmの光電子放出顕微鏡像を測定し、軟X線領域における元素選別PEEM

(EXPEEM)を実現した。

(3)XANAM法の開発

Si基板上にAu薄膜を蒸着し、X線を照射しながら、ノンコンタクトAFM法で力の定数の変化を調べた。Au薄膜上にAFM探針先端をおき、Au L3吸収端と同じエネルギーをもつX線を照射すると、原子間力が変化を示した。X線を併用しながら、AFMを掃引することで、表面元素の原子レベル分布を出すことができると期待される。

III. 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

C13. 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)多層カーボンナノチューブの固化

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を添加し、放電プラズマ焼結(SPS)法を採用することにより、密度1.7g/cm³、ヤング率3-10GPaと骨の物性(1.6-2.1g/cm³, 7-30GPa)に近いCNTの焼結固化バルク体を得た。

3点曲げ試験では固化体は弾性限を越えても通常のセラミックスのような脆性破壊は示さず、繊維状の多層カーボンナノチューブの引抜きのために、破壊が徐々に進行し、見かけ上、擬似塑性変形を示す。固化温度が1000℃と低いと

多層カーボンナノチューブ間の結合が弱いため引き抜きのみが起きる。1200℃以上に温度を上げると、ナノチューブ間の結合が強くなり多層カーボンナノチューブの破断が起きようになり、固化体全体の強度も大きくなる。ナノチューブの引抜きはなお起きるため、塑性変形的挙動は維持され材料としての信頼性は高いまま維持される。

(2) ハイドロキシアパタイト被覆

CaHPO₄·2H₂O と Ca(OH)₂ の懸濁液を固化カーボンナノチューブの表面に塗布後、SPS で加圧・加熱することによりハイドロキシアパタイト被膜を作ることにより成功した。1000℃、120MPa の加圧下で生成被覆したアパタイト膜は密着性がよく、切断などの加工を施しても剥げ落ちなかった。Ti 板については 600MPa の加圧下、250℃から 350℃の範囲で密着性の良い膜を作ることができた。

C14. 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

単層カーボンナノチューブ(SWNT)を合成後、固化体を SPS で 1000℃、120MPa の条件下で作製し、機械的特性をスモールパンチ(SP)試験を用いて評価した。

未精製の煤を使用した焼結体は脆性破壊を起こした。一方、精製を行った SWCNT 焼結体では荷重の増加後にわずかな荷重低下を示すが、その後再び増加し最大荷重に達する非弾性変形的破壊挙動を示し、大幅な変位と仕事量の増加が観察された。フェノール樹脂を 50mass% 添加した焼結体で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破壊挙動を示した。荷重と縦弾性係数は SWCNTs 焼結体に比べ増加するが、最大荷重までの仕事量には大きな差は観察されなかった。

未精製の焼結体では、試料内に多く含まれている炭素系の不純物に起因する焼結固着のため、通常のセラミックスに見られる脆性破壊を生じ

た。一方、精製高純度化した SWCNTs では非弾性変形を生じ、大幅な変位の増加とそれに伴う顕著な破壊エネルギーの増加を示した。

(2)-SWCNT 焼結体の最適作製条件-

バインダーレス SWCNT 焼結体の縦弾性係数、破壊エネルギーは焼結温度および圧力の増加に伴い、増加する傾向を示したが、1400℃、120MPa の条件では破壊エネルギーは低下した。ラマン散乱測定より、部分的に円柱状のバンドル構造からシート状の構造に変化し、SWCNTs の存在比が低下していることが観察され、焼結過程のプラズマの効果、焼結温度および圧力の相乗作用により SWCNTs に構造変化が生じたことが確認された。

SWCNTs のみを SPS 法にて焼結体を作製することで、未精製焼結体では得られなかった非弾性変形を示す固化体の作製が可能となった。

(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

熱間等方静水圧プレス (HIP) を擬似的に実現する二重構造カプセル法を開発し、圧力 40MPa、温度 135℃、24h の処理条件でアパタイトコーティング材を作製することができた。これにより 135℃もの低温で芯材全面わたり HA セラミックスをコーティングすることが可能となった。引抜試験後、き裂が HA/Ti 界面ではなく、HA コーティング中を進展していることが観察され、界面強度は HA コーティング自体と同等ないしそれ以上のせん断強度を有していること、かつ従来の方法では不可避であった熱分解のない HA コーティングが作製できることが示された。

C15. 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* 動物埋入試験

CNF 集塊は肉芽組織に被包されているものの強い炎症反応は観察されず、TEM 観察ではその多くがマクロファージに貪食され、ライゾソーム内にも認められた。

ラット腹部皮下に埋入した CNT 集塊は肉芽

組織に被包され、周囲にはマクロファージや異物巨細胞が観察された。TEM 観察では CNT 周囲に接してマクロファージや異物巨細胞が認められたが、貪食像はほとんど観察されなかった。

CNT を固化体として皮下組織に埋入した場合、結合材を使用しない場合には軽微な炎症が生じるのみであるが、phenol resin や polycarboxysilane を結合材として用いた場合、結合材の濃度に応じた炎症反応が認められた。

2) *in vitro* 細胞培養試験

ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 Saos2 を吸引濾過 CNT コーティング PTFE 膜および PC 膜上で培養すると、CNT なしよりも細胞の増殖および伸展は速い傾向を示した。トリプシン処理を行った後も、細胞は球状に形態は変化するものの、CNT が細胞に複雑に嵌合し剥離されない細胞が多数認められた。

CNT を吸着させた膜上で培養した場合、CNT を吸着していない膜上での培養と比較し、骨芽細胞の増殖は促進された。増殖は基盤となる膜の性状に影響を受け、細胞とナノチューブは強固に結合していることが示された。

C16. 高分子膜のナノ構造制御による医療用アクチュエータへの応用

(1) 膜状電解質高分子のナノ構造制御による特性改善

含水率が高く数日で劣化する Nafion 試料を表面にドータイト(金属粉末を含んだ電気伝導性の接着剤)を塗布、PMMA で表面被覆することにより、大気中数週間までの劣化抑制を可能とし、弾性率の向上と発生力の約6倍増を達成した。また少量の水分子が膜中に残るよう脱水することにより、発生力の低下を抑制できた。

(2) 医療用アクチュエータへの応用

240 °C 付近で加熱成形し、Nafion 表面に複雑な電極パターンをメッキすることにより、目的に応じた動きをするアクチュエータとして利用し、心臓や四肢の柔軟な動きを模倣するマイクロポンプを試作した。

D. 考察

D1. 微粒子と生体反応

Ti をはじめとするバイオマテリアルに対しても生体反応は、微粒子サイズが小さくなると炎症性反応が増加し貪食を誘発するサイズ依存性を示す。約 100 μm 以上の Ti 粒子は生体親和性を示すが、50 μm 以下では炎症性反応を惹起し、10 μm 以下になると貪食を誘発し、長期間強い炎症を引き起こす。

これはマクロなサイズの試料で通常支配的な、材料の化学的性質に基づきイオン溶出を經由して現れる生体為害性とは異なり、生体親和性を示す材料にも微粒子になると現れる材質非依存的な物理的サイズ依存性を示す細胞毒性である。

mm,cm,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い。しかしおよそ 100 μm 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亢進し、細胞大の 10 μm 以下になるときわめて顕著になり、この傾向は μm から nm 領域まで続いている。人工関節の骨頭摺動部に発生する摩耗粉や DDS の移送過程で典型的に問題になる。

今年度は細胞の種類を多岐にし、微粒子も金属から酸化物、磁性粒子、生分解性ポリマーをカバーし、均一粒度、濃度・粒子数・比表面積をそれぞれ一定にした条件下で、カーボンナノチューブについては表面処理と nm スケールでサイズ制御した CNT, CNF を用い、とりわけ重点的に微粒子に対する生体反応性を調べた。

D2. 微粒子とナノトキシコロジー

粉塵の人体への影響については、粒径が 10 μm 以上では鼻道や上気道で捕捉・排出される、5 μm 以下では肺胞まで到達する、5 μm 以上でも繊維状・針状粒子では肺に到達する可能性がある、また呼吸器粘膜に付着し刺激性を引き起こす、可溶性や親油性の強い粉塵は血中に溶解し全身中毒の原因となる等、主として吸入時のフィルター効果に関する情報が一般的に知られている。

粒径のほかに、ナノパーティクルでは比表面

積が大きい、反応活性度が高い、浮遊しやすい、等の性状が顕著になることから、もともと為害性がある Be, Cd, V, Mn, Ni 等では当然、毒性は強くなる。

では生体親和性(bioactive)・生体不活性(bioinert)材料の微粒子ではどのようになるであろうか。

(1)in vitro :

本研究の細胞機能性試験で明らかにした結果によれば、物理的サイズ効果に起因する細胞刺激性の強さは細胞内毒素に比べれば 1/100 ~ 1/10000 のレベルである。純粋に材料だけならば細菌やある種の蛋白質の刺激に比べれば、こうした材料のサイズ・形状効果という材質非依存的な物理的刺激は短期的にはあまり問題が無いレベルと思われる。逆に患者から飛散した場合には付着している細菌や蛋白質によって為害性が桁違いに強くなることも示唆される。

-(2)in vivo :

問題は Ti, Fe, Ni 等の金属系微粒子ではマクロファージ、好中球等に貪食された後、他の臓器への移送、体外への排出はされずに、細胞死を誘導し、炎症性サイトカインを放出して炎症性細胞浸潤を誘発しながら、局所に残留する、こうしたプロセスを繰返し、炎症が長期継続する点にある。細菌等による内毒性のレベルは桁違いに高く、局所的に顕著な為害性をもたらすものの、多くの場合、回復治癒とともに原因物質は除去され、一過性のイベントとして完了し、またもとの状態に回復する。しかしインプラント骨頭摺動部からの摩耗粉の発生はその原因物質が次々に組織に追加的に注入され、生体組織は経時的に炎症発現要因が増加する一方の状況にさらされる。

その他、以下のようなナノパーティクルの体内挙動の可能性が考えられる。

長期的には播種された数ミクロン以上の大きさのバイオマテリアル微粒子は組織中で長期にわたり排出されずに残留する。貪食された粒子は処理されることはなく、細胞死とともに局所に残留した。しかしながら他部位に流出する粒子はほとんど認められず、血液検査からイオンは検出されなかった。結果として、局所で線維

組織にかなりの部分が被包化されるが、取り残しが散在する。

サブマイクロ・ナノ粒子では組織内での移動や血管内皮細胞の間隙に侵入し、広範囲に残留し続けた。組織の炎症は長期に及び、微粒子も局所で安定化されることなく血管・リンパに侵入し全身を回る可能性がある。二酸化チタンの 500nm 以下の粒子はマクロファージが細胞内を満たすほど貪食し、細胞が黒く見える。組織間隙にも粒子が広く分布し、周囲に造成した血管内皮細胞にも微粒子は取り込まれていた。微粒子を取り込んだマクロファージは局所で細胞死を迎える可能性が高いが、線維芽細胞はそのまま増殖を続けた。また、線維芽細胞周囲の微粒子は細胞外基質にも取り込まれた。またナノ・サブミクロン粒子は凝集して二次粒子を形成したり、静電的な力によると考える細胞膜への集積も認められた。この結果 1 次粒子から期待される効果とは異なる作用を示すことも考えられる。さらに小さなナノ粒子になると生体の防御機能を免れ、細胞の中や細胞間隙を通過しやすくなり、血中への移行、血流を介して全身に拡散し、暴露部位以外の臓器にも影響を及ぼす可能性がある。

D 3. カーボンナノチューブの生体反応性

カーボンナノチューブに対する生体反応性を、検査用プローブとして多岐にわたる細胞(in vitro)および軟組織(in vivo)を用い、種々の検査項目について調べた。

下記にそれらの種類を示す。

[検査用プローブ細胞・組織]

in vitro :

- ヒト好中球
- ヒト歯根膜由来線維芽細胞
- ヒトマクロファージ THP-1
- ヒト由来真皮繊維芽細胞 HF (p17)
- ヒト HEK293(human embryonic kidney)
- ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 Saos2
- H1299 肺ガン細胞
- ラット腹腔・肺胞マクロファージ

マウス脾臓細胞(C57BL/6)
マウス筋芽細胞 C2C12 細胞
マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株
MC3T3-E1 細胞
ゾウリムシ

in vivo :

ラット皮下軟組織

[検査項目]

in vitro :

細胞生存率、LDH 活性値、活性酸素放出量
サイトカイン放出量(IL-1 ,TNF- ,)
炎症性サイトカイン IL-1 ,TNF- ,
好中球走化性因子 IL-8
マクロファージ刺激因子 GM-CSF
細胞増殖率
細胞形態
ラット経口投与試験－血液検査・生化学
検査(白血球、グロブリン、...)
ゾウリムシ細胞生存率
血管内投与(Ce カーボンナノカプセル)

in vivo :

ラット軟組織病理組織像

主な細胞・組織に対する生体反応性は下記の通りである。

1. in vitro

(1)ゾウリムシ(in vivo か?) :

ゾウリムシの食胞形成能に大きな影響は与えず、摂食行動に有害な影響は残らなかった。

分裂停止期の細胞に対して、NiO および NiFe₂O₄ では細胞生存率は濃度に依存して低下し、細胞死を導くが、CNT は濃度によらず生存率に影響は認められず、細胞は生きたままであった。

細胞増殖に対する影響では、NiO および NiFe₂O₄ は共に強い増殖阻害効果を示したのに対し、CNT では濃度を増しても阻害効果には限度があった。

(2)ヒト好中球、ヒト歯根膜由来線維芽細胞、ラット腹腔・肺胞マクロファージ :

CNT 上でヒト線維芽細胞は生着が早く、増

殖および伸展は微粒子サイズの影響を受けた。細胞突起が伸長し、細胞膜との嵌合や細胞外基質との結合のため、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。炎症性サイトカインの放出を認めたが、為害作用は低かった。

(3)ヒトマクロファージ THP-1、マウス脾臓細胞(C57BL/6) :

CNT および CNF は、生体にとって異物として認識されるものの、その活性は微生物由来物質に比べると 1/2000 以下できわめて弱い。

(4)マウス筋芽細胞 C2C12 細胞、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞 :

DNA 合成量ならびに生細胞数は有意差はほとんど認められなかった。

(5)ヒト由来真皮繊維芽細胞 HF (p17) :

ヒト由来真皮繊維芽細胞 HF (p17) に対して CNT による影響は全く観察されず、可溶性 CNT は細胞増殖促進能、障害能のどちらも有していなかった。

(6)ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 Saos2 :

CNT 上で骨芽細胞の増殖は促進され、細胞は伸展した形態を示した。トリプシン処理を行った後も、細胞は球状に形態は変化するものの、CNT が細胞に複雑に嵌合し剥離されない細胞が多数認めら、増殖細胞とナノチューブは強固に結合していることが示された。

(7)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が、急性毒性症状等は観察されず、為害性は認められなかった。

(8)ヒトマクロファージ THP-1、ラット腹腔・肺胞マクロファージ :

血管内投与試験(カーボンナノカプセル (Ce-CNC))において、ラットの肺胞、腹腔マクロファージ及び THP-1 細胞に対する Ce-CNC の細胞刺激性はチタン微粉末と同程度であり、為害性が十分に低いことが示唆された。

2. in vivo

(1)ラット皮下軟組織 :

①ヒト好中球、ヒト歯根膜由来線維芽細胞、ラット腹腔・肺胞マクロファージ：

CNT および CNF を皮下組織に埋入した場合、周囲組織に短期的な炎症症状が発現するが、長期に持続する強い炎症反応は惹起しなかった。

CNF はマクロファージや異物巨細胞に貪食され、異物として生体反応を惹起するが、その反応は他バイオマテリアルと比較すると弱かった。

②ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 Saos2：

CNF および CNT を皮下組織に埋入した場合、周囲組織に強い炎症反応は惹起しなかった。CNF の多くはマクロファージや異物巨細胞に貪食されるが、CNT はほとんど貪食されなかった。

以上の結果はいずれも、試験開始時の組織の開創や培養液への添加など異物挿入に伴う細胞・組織刺激性が沈静化した後は、材料に非特異的に起きる物理的サイズ効果が主となり、その反応の程度は生体親和性(bioactive)・生体不活性(bioinert)材料一般に起きると同程度か、より弱いことで一致している。この微粒子サイズ効果による細胞刺激性は細胞内毒素に比べると 1/1000 以下と低い。貪食後、金属 Ti, Fe, Ni(Ni は化学的に本来、為害性あり)や一部の酸化物(NiO, NiFe₂O₄)では細胞死するが、CNT ではゾウリムシは細胞死せず、他の細胞でも細胞死しないものがある。

細胞生存率、増殖率、LDH 産生量、活性酸素産生能、サイトカイン(TNF- α , IL-1b, IL-8, GM-CSF)産生量性などの細胞機能性試験の各指標はサイズ依存性を示し、一般の微粒子ではサイズが小さくなるほど細胞刺激性は増大し、ナノ領域にも効果が継続しているのに対し、CNT では逆に μ m 以下では見かけ上、サイズが小さくなるほど細胞刺激性は低下する結果になっている。

このように今回行った試験条件におけるあらゆる結果は、CNT には 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、特異的な生体為害性は認められないことを示している。むしろ実験結果は細胞・組織に対する特異

的な種々の親和性を有することを示唆している。

CNT 表面は本来、疎水性で細胞付着性にすぐれ、また糖鎖または高分子糖化合物が吸着しやすく、一旦付くとまた容易にはがれない。生体組織を構成する重要な蛋白質線維であるコラーゲンと相互作用が強く吸着しやすい。人工体液等のカルシウム塩、リン酸塩の存在下でアパタイトが析出しやすい。また細胞が増殖しやすく、増殖細胞の形態は伸展している。また薬液で CNT スカフォールドから細胞中央部を剥離しても突起が嵌入しているため、細胞が剥離しない。屈曲しやすい。…等である。

この中の性質の一部には CNT 表面に蛋白質やリン酸カルシウムなど細胞培養液成分を吸着している、CNT がきわめて微小になると起きやすい凝集効果が起き、結果として粒径の大きな粒子として働く等の 2 次的効果が作用している可能性もある。

また CNF の多くはマクロファージや異物巨細胞に貪食されるが、CNT はほとんど貪食されなかったという異なる生体反応性も得られており、また SWCNT と MWCNT でも異なる可能性がある。

アスベストには肺ガンを引き起こす発ガン性があることはよく知られているが、繊維状結晶という類似の形態を持つ連想から、同様な危険性があるという指摘がなされている。今回行った短期的な試験結果の範囲内では、特異的なあるいは強い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生体親和性的性質が多数見出された。

市販のカーボンナノチューブは物理・化学・工業的応用を念頭に置いており、そのままではバイオ応用には不適當である。アモルファスカーボンや触媒としての Ni や Fe 微粒子を含んでおり、とりわけ Ni 微粒子は強い為害性を誘起する。本研究では精製高純度化を行い、アモルファスカーボンや触媒を除去し、その他の諸特性も含め素性の明らかな試料を使用している。文献の中には厳密に精製処理をせぬままに試験しているため、不純物という副次的な効果を拾っているものも含まれている可能性がある。生体親和性(bioactive)・生体不活性(bioinert)材料

で生体適合性試験を行うと条件に左右されやすく結論が曖昧なわかりにくい結果になりやすいが、生体為害性物質を入れると、途端にきわめて明快な結果になるのは、この分野の研究でよく経験することである。

D 4. バイオ用カーボンナノチューブの開発と単体の応用

カーボンナノチューブをバイオ応用するには現状のものでは不適當である。これはカーボンナノチューブと称しても含有率が低く、触媒としてのNi微粒子を含んでおり、また疎水性で凝集しやすく単体として取り出せない、直径はnmでも長さは数 μ mと長過ぎる、またサイズが揃いであること等のためである。これらには次のような課題がある。

1)大量合成、2)精製：アモルファスカーボン除去、3)高純度化：触媒(Ni)除去、4)凝集：可溶化・分散化・単離、5)サイズ：切断、6)表面修飾：分子結合

このうち昨年度は1)アーク放電法を使用し、種々の触媒金属を用いることにより、単層・多層ナノチューブの大量合成が可能になり、2),3)燃焼酸化、酸処理などにより精製高純度化を達成した。

今年度は4)凝集：可溶化・分散化・単離、5)サイズ：切断、6)表面修飾：分子結合の問題に取り組むことを主たる目標に研究を行った。

(1)バイオ用カーボンナノチューブの開発

①CNT, CNF

強酸中の超音波照射で切断後、遠心分離とフィルター分離を併用しサイズ分離を行った。CNTで平均長670nm、540nm、220nm、CNFで1.5 μ m、800nm、400nmの長さに分離に成功した。水酸基とカルボキシル基の親水基ビークが付加され、湿式オゾン処理により、エポキシド結合を導入し、表面改質とバイオ応用に適したサイズに調整した可溶性ナノチューブの作製が、高い回収確立で可能となった。

②CNF/アルジネートコロイド

親水性と分散性に富む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。

③糖鎖修飾

糖鎖による表面修飾をPVLAなどの人工複合糖質高分子(ポリスチレン骨格)で容易に達成した。特にポリスチレン型の人工糖質高分子は表面に強く吸着し、また糖鎖が密に存在するためタンパク質の非特異吸着を抑制した。ポリスチレン型の表面に存在する糖鎖は相当するレクチンにより選択的に認識され、正常に発現した。

PVLAの結合は、PBSやH₂Oでの洗浄でははがれない程度に強く、また、PVLAはMWCNTの表面にチューブの形に添って密に配置している。MWCNTの表面の糖鎖は、相当するレクチンにより選択的に認識されるとともに、非特異的な吸着をブロックする。さらにMWCNT/糖鎖は密集して結合できるので、糖鎖シグナルとして増強(糖鎖のクラスター効果)される利点がある。

(2)カーボンナノチューブ単体の応用

バイオ応用に関して多くの興味深い性質が見つけ出された。

①細胞付着性

CNTの表面は疎水性で細胞の生着性にすぐれていた。

②糖鎖修飾

糖鎖修飾により細胞付着性ほかを制御できる可能性あり。

③ろ過膜へ固定化→スカフォールドへの応用

CNT吸着ろ過膜上で骨芽細胞の増殖は促進され、形態は伸展、細胞とナノチューブは強固に結合した。

④コラーゲンへ固定化

エッチング処理した歯質に対し、エナメル質には吸着されず、コラーゲン線維が露出した象牙質疎水的な相互作用により選択的に吸着された。

⑤食食誘発性

CNF, CNTの結晶構造の違いを反映して組織反応性(食食)に違いあり。

⑥アパタイト析出

擬似体液にTiを浸漬すると表面にリン酸カルシウムが析出することが知られているが、CNTでもCNTをコアとしてアパタイト結晶

が放射状に析出し、容易に表面修飾が可能であった。

⑦アルジネートカプセル

CNF が酸性の胃液中で凝集するのを避け、腸から吸収されるように 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を作製し、ラットへの経口投与、吸収を介しての血液成分の生化学的試験に応用した。

⑧カーボンナノカプセル

Ce 含有カーボンナノカプセルの為害性が低いことを確認後、血管内投与し、体内循環、臓器への濃縮を検知した。

⑨CNT 複合材料

カーボンナノチューブとの繊維強化金属 (FRM)、繊維強化プラスチック (FRP) を試作した。

⑩遺伝子導入用担体への応用

CNFs/Na-ALG 複合体に pCMV b-Gal 発現プラスミドを結合し、H1299 肺ガン細胞株への輸送に応用した。

D 5. カーボンナノチューブ焼結バルク体の作製とその特性

①SPS

カーボンナノチューブの物性を利用する用途としては通常単体としての利用が念頭にあり、バルク体としての発想とその開発は本研究が初めてである。その大きな理由の一つとして炭素材料では焼結が困難で超高温で焼結を強行するとナノチューブ構造が解体し、本来目標とする材料が容易に損なわれてしまう点があった。本研究では日本で開発された放電プラズマ焼結法を採用することにより実現を可能とした。この方法では粉末粒子間にプラズマが発生し、焼結促進、焼結温度の低温化が図れるとされる。

②多層カーボンナノチューブ(MWCNT)固化体

バインダーとしてフェノール、ポリカルボシランを使用し作製

③単層カーボンナノチューブ(SWCNT)固化体

バインダーとしてフェノール使用。また結合材を用いず、生体為害性の少ないバインダーレスも実現。

④機械的特性—骨と類似

密度 1.7g/cm^3 、ヤング率 $3\text{-}10\text{GPa}$ と骨の物性 ($1.6\text{-}2.1\text{g/cm}^3$, $7\text{-}30\text{GPa}$) に近い。

⑤機械的特性

従来、セラミックスは金属に較べると化学的に不活性で生体適合性にすぐれてはいるものの、脆性材料で破壊しやすく信頼性に劣り、破面が鋭角状で組織を傷つけやすい欠点があった。また骨に比べてヤング率が高く、衝撃力の応力緩和が図れないために、周囲組織に過大な負担を課すことや逆に組織への重力負荷刺激が少なく、骨が菲薄化するなど、インプラントとして硬すぎる難点があった。

CNT 固化体では弾性限を越えても通常のセラミックスのような脆性破壊は示さず、繊維状のCNTの引抜きのために、破壊が徐々に進行し、見かけ上、擬似塑性変形を示す。ナノチューブ繊維が引き抜かれる摩擦抵抗力により、通常のセラミックスで見られるような亀裂の進展が阻止され、荷重を保持し続けるものと考えられる。

ナノチューブバルク体に見られる準脆性はセラミックスの機械的特性としてきわめて特異的で、今後、最適作製条件、物性の改善などさらなる改良が必要であるが、破壊靱性値やヤング率の観点から生体にやさしい新しいセラミックス生体材料になり得る可能性がある。加えて化学的に不活性で耐食性に富むから、為害性を惹起する要因は少ない。またその結晶構造から各種成長因子や薬剤等の吸蔵性にも富むと予想され、体内中で患部に近接して長期徐放する等の応用に向けた吸蔵性、徐放性も応用の可能性と考えられる。

⑥アパタイトコーティング—SPS

$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と $\text{Ca}(\text{OH})_2$ の懸濁液を固化カーボンナノチューブの表面に塗布後、SPS で加圧・加熱することによりハイドロキシアパタイト被膜を作ることに成功した。

⑦アパタイトコーティング—二重カプセル(擬似HIP)

熱間等方静水圧プレス (HIP) を擬似的に実現する二重構造カプセル法を開発し、強固なHA/Ti 接合強度を有するアパタイトコーティング材を作製することができた。

生体不活性な材料の表面に HA をコーティングする方法として、従来用いられているプラズマ溶射などによるセラミックスコーティングと比較すると、本法で作製された HA コーティングは、結晶成長によるものであり、熱分解は認められず、生体内での溶解などによる消失は起きにくいと考えられる。

⑧動物埋入試験

バインダーとしてフェノール、ポリカルボシランを使用し作製した MWCNT 固化体では結合材濃度が高いほど炎症性が増した。アパタイトコーティング材では良好な新生骨形成が認められた。

E. 結論

およそ 100 μm 以上の Ti 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 μm 以下では炎症性反応を惹起し、特に 10 μm 以下になると貪食作用を誘発し、長期間強い炎症性反応を引き起こし、溶解イオンとしての化学的効果とは異なる、微粒子の物理的サイズ効果として細胞毒性を引き起こす。

このような効果は Ti, Ni, Fe, Au, TiO₂, TiN, SiO₂ の微粒子、カーボンナノチューブのいずれにも見いだされ、物質によらない効果であると考えられる。そのメカニズムは主として微粒子と細胞・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、 $\mu\text{m} \sim \text{nm}$ になると bioactive, bioinert 材料でも、材質非依存的な物理的サイズ効果が顕在化する。

アスベストと同様な毒性の可能性が指摘された CNT について、今回行った試験条件におけるあらゆる結果は、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、特異的な生体為害性は認められないことを示している。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をが多数見出された。

「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？」、このナノトキシコロジーの問題に回答するために、将来的にはより組織的に研究を進展させ、(1)材料がマイクロ/ナノサイズ化したときの生体反応性の生化学的手法による評価、(2) ナノマテリアル、ナノメディシン開発の指針と判断基準となるデータの取得提供を行い、その上で、(3)バイオ応用展開を図ることが必要と考えられる。

バイオ用カーボンナノチューブとして、バイオ応用に適したサイズに調整した可溶性ナノチューブ、親水性と分散性に富む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できる糖鎖修飾および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、高い細胞付着性の利用、スカフォールドへの応用、コラーゲンとの相互作用による歯質の選択吸着、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、CNT 複合材料の作製、遺伝子導入用担体への応用を行った。

カーボンナノチューブ焼結バルク体として、SPS 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 Ti 表面に水熱合成結晶成長により、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 亘理文夫、田村一央、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、戸塚靖則、古月文志、佐藤義倫、田路和幸：微粒子と生体反応、ナノ学会会報 2(1), 33-37, 2003
- 2) 亘理文夫、松尾晋吾、佐藤範幸、上田康夫、大畑昇：傾斜機能型デンタルポストの応用緩和効果、2002年度傾斜機能材料論文集〈FGM2002〉, 93-97, 2003
- 3) Atsuro Yokoyama, Hironobu Matsuno, Satoru Yamamoto, Takao Kawasaki, Takao Kohgo, Motohiro Uo, Fumio Watari, Masanori Nakasu: Tissue response to a newly developed calcium phosphate cement containing succinic acid and carboxymethyl-chitin, 2003 Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res 64A: 491-501, 2003
- 4) 亘理文夫：傾斜機能型人工歯根の開発と課題、傾斜機能材料の開発と応用、シーエムシー出版編、149-158, 2003
- 5) 横山敦郎、川崎貴生、亘理文夫：生体材料（デンタルインプラント）を目的とした傾斜機能材料の作製と生体反応、化学工業 54(11), 13-18, 2003
- 6) Junko KONISHI, Fumio WATARI, Chiharu KAWAMOTO, Hidehiko SANJO: Effect of Sphered Particles on the Firing Contraction of Porcelain Inlay Processed by Cold Isostatic Pressing, Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 66B: 553-558, 2003
- 7) Magda Kiyoko Yamada, Fumio Watari: Imaging and Non-Contact Profile Analysis of Nd:YAG Laser-Irradiated Teeth by Scanning Electron Microscopy and Confocal Laser Scanning Microscopy, Dental Materials Journal 22, 556-568, 2003
- 8) Magda Kiyoko Yamada, Motohiro Uo, Shoji Ohkawa, Fumio Watari: CLSM and SEM quantitative analysis of surface topography of human teeth irradiated by Nd:YAG, Er:YAG and CO₂ lasers, International Congress Series 1248, 135-137, 2003
- 9) Kazutoshi TANI, Fumio Watari, Motohiro Uo: Discrimination between Composite Resin and Teeth using Fluorescence Properties, Dental Materials Journal 22, 569-580, 2003
- 10) Atsuro Yokoyama, Hironobu Matsuno, Satoru Yamamoto, Takao Kawasaki, Takao Kohgo, Motohiro Uo, Fumio Watari, Masanori Nakasu: Tissue response to a newly developed calcium phosphate cement containing succinic acid and carboxymethyl-chitin, 2003 Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res 64A: 491-501, 2003
- 11) Motohiro Uo, Goran Sjogren, Anders Sundh, Fumio Watari, Maud Bergman, Ulf Lerner: Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics, Dental Materials 19, 487-492, 2003
- 12) Motohiro Uo, Anders Berglund, Juan Cardenas, Lars Pohl, Fumio Watari, Maud Bergman, Staffan Sjoberg: Surface analysis of dental amalgams by X-ray photoelectron spectroscopy and X-ray diffraction, Dental Materials 19, 639-644, 2003
- 13) Min Ho Lee, Dong Joo Yoon, Dae Hee Won, Tae Sung Bae, Fumio Watari: Biocompatibility of Surface Treated Pure Titanium and Titanium Alloy by in vivo and in vitro Test, METALS AND MATERIALS International 9(1), 35-42, 2003
- 14) N. Suwa, F. Watari, S. Yamagata, J. Iida, M. Kobayashi: Static-Dynamic Friction Transition of FRP Esthetic orthodontic wires on various brackets by suspension type friction test, Biomedical Materials Research 66, 765-771, 2003
- 15) 豊泉裕、亘理文夫、今井徹、小林雅博、山方秀一、飯田順一郎：光重合法によるアーチ型審美矯正ワイヤーの開発、歯科材料・器械 21(5), 271-277, 2002
- 16) 山方秀一、飯田順一郎、今井徹、亘理文夫、小林雅博：審美性に優れた歯科矯正ワイヤーの開発、材料と環境 51(12), 555-560, 2002
2. 学会発表
- 1) 田村一央、戸塚靖則、赤坂司、宇尾基弘、大川昭治、菅原敏、亘理文夫：カーボンナノチューブとナノ・マイクロ微粒子に対する生体反応、歯科材料・器械 22(2), 57, 2003

- 平成15年度春期第41回日本歯科理工学会学術講演会, H15/4/18-19, 学術総合センター (東京)
- 2) 近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇尾基弘、大川昭治、菅原敏、赤坂司、亘理文夫：放電プラズマ焼結法で作製した窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの物性と生体適合性の評価、*歯科材料・器械* 22(2), 55, 2003
- 平成15年度春期第41回日本歯科理工学会学術講演会, H15/4/18-19, 学術総合センター (東京)
- 3) 岩崎佳治、大川昭治、宇尾基弘、赤坂司、菅原敏、亘理文夫：チタンと歯科用貴金属合金のレーザー溶接による接合、*歯科材料・器械* 22(2), 122, 2003
- 平成15年度春期第41回日本歯科理工学会学術講演会, H15/4/18-19, 学術総合センター (東京)
- 4) ヤマダ・マギダ・キヨコ、宇尾基弘、大川昭治、赤坂司、亘理文夫：Nd-YAG, Er-YAG, CO₂ レーザー照射した歯質の表面形態観察とスペクトル分析、*歯科材料・器械* 22(2), 124, 2003
- 平成15年度春期第41回日本歯科理工学会学術講演会, H15/4/18-19, 学術総合センター (東京)
- 5) 谷和俊、森田学、宇尾基弘、大川昭治、菅原敏、亘理文夫：歯質レジン及びポーセレン修復部の識別に関する分光学的研究、*歯科材料・器械* 22(2), 80, 2003
- 平成15年度春期第41回日本歯科理工学会学術講演会, H15/4/18-19, 学術総合センター (東京)
- 6) 神島菜穂子、大畑昇、亘理文夫、宇尾基弘、大川昭治、赤坂司：歯質への各種レジンモノマーの拡散の測定、*歯科材料・器械* 22(2), 131, 2003
- 平成15年度春期第41回日本歯科理工学会学術講演会, H15/4/18-19, 学術総合センター (東京)
- 7) 田中聡、山方秀一、宇賀大、諏訪伸輔、飯田順一郎、宇尾基弘、大川昭治、赤坂司、菅原敏、亘理文夫：湿潤状態での矯正用ワイヤーの曲げ破壊に及ぼす諸要因の検討、*歯科材料・器械* 22(2), 60, 2003
- 平成15年度春期第41回日本歯科理工学会学術講演会, H15/4/18-19, 学術総合センター (東京)
- 8) 亘理文夫、田村一央、高師則行、野田坂佳伸、戸塚靖則、宇尾基弘：ナノチューブ・ナノ微粒子・マイクロ微粒子と細胞・組織の相互作用、*日本顕微鏡学会第59回学術講演会発表要旨集*, 156, 2003
- 日本顕微鏡学会第59回学術講演会, H15/6/7-9, 札幌コンベンションセンター
- 9) 宇尾基弘、亘理文夫：走査型X線分析顕微鏡による生体軟組織中の元素マッピング、*日本顕微鏡学会第59回学術講演会発表要旨集*, 9, 2003
- 日本顕微鏡学会第59回学術講演会, H15/6/7-9, 札幌コンベンションセンター
- 10) K.TAMURA, N.TAKASHI, B.HUGETU, K.TOHJI, Y.TOTUKA, M.UO, T.AKASAKA, F.WATARI: In vitro and In vivo Study of the Effects of Fine Particles on Biocompatibility, *J.Dent.Res.82(IADR Abstracts)*, 389, 2003
- 81th IADR(Int.Assoc.for Dent Res.), Goteborg(Sweden), June 25-28, 2003
- 11) M.UO, F.WATARI, T.KOHGO: The Application of X-ray Scanning Analytical Microscope (XSAM) for the Analysis of Biological Tissues, *J.Dent.Res.82(IADR Abstracts)*, 62, 2003
- 81th IADR(Int.Assoc.for Dent Res.), Goteborg(Sweden), June 25-28, 2003
- 12) T.TAKASHI, K.TAMURA, F.WATARI, Y.YOKOYAMA: Effects of Exudates on the Function of Human Neutrophils, *J.Dent.Res.82(IADR Abstracts)*, 219, 2003
- 81th IADR(Int.Assoc.for Dent Res.), Goteborg(Sweden), June 25-28, 2003
- 13) S.OHKAWA, K.ISHII, M.UO, T.SUGAWARA, F.WATARI: Production of a Ti-Cu Solder by Mechanical Alloying, *J.Dent.Res.82(IADR Abstracts)*, 61, 2003

- 81th IADR(Int.Assoc.for Dent Res.),Goteborg(Sweden), June 25-28, 2003
14)K.TANI, M.NORITA, S.OHKAWA, M.UO, F.WATARI: Spectroscopic Research for the Visual Differentiation of Aesthetic Materials in a Restored Tooth, J.Dent.Res.82(IADR Abstracts)261, 2003
- 81th IADR(Int.Assoc.for Dent Res.),Goteborg(Sweden), June 25-28, 2003
15)巨理文夫：「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」の課題、厚生労働科学研究補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業 ナノメディシン分野「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」（課題番号：H14-ナ-021）平成15年度夏期・第3回目標策定研究発表会抄録集、H15/9/9-10,松島（松島大観荘）
- 16)巨理文夫：傾斜機能デンタルインプラントの作製、第2回傾斜機能材料の実用化に関するワークショップ資料、41, 2003
H15/9/12, 工学院大学新宿校舎
- 17)田村一央、高師則行、赤坂司、ロスカイオシフ、宇尾基弘、菅原敏、大川昭治、戸塚靖則、巨理文夫：歯根膜由来細胞に対する微粒子の影響、歯科材料・器械 22(5), 315, 2003
平成15年度秋期第42回日本歯科理工学会学術講演会, H15/9/19-20, 盛岡市民文化ホール
- 18)赤坂司、宇尾基弘、大川昭治、菅原敏、巨理文夫：象牙質へのカーボンナノチューブ吸着による表面改質、歯科材料・器械 22(5), 397, 2003
平成15年度秋期第42回日本歯科理工学会学術講演会, H15/9/19-20, 盛岡市民文化ホール
- 19)近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇尾基弘、大川昭治、菅原敏、赤坂司、巨理文夫：乾式合成法によるTi-HAP複合体の作製と評価、歯科材料・器械 22(5), 332, 2003
平成15年度秋期第42回日本歯科理工学会学術講演会, H15/9/19-20, 盛岡市民文化ホール
- 20)岩崎佳治、大川昭治、宇尾基弘、赤坂司、菅原敏、巨理文夫：チタンと歯科用貴金属合金の開先形態におけるレーザー溶接、歯科材料・器械 22(5), 403, 2003
平成15年度秋期第42回日本歯科理工学会学術講演会, H15/9/19-20, 盛岡市民文化ホール
- 21)神島菜穂子、佐藤範幸、宇尾基弘、大川昭治、赤坂司、菅原敏、大畑昇、巨理文夫：象牙質への各種レジンモノマーの浸透度の比較、歯科材料・器械 22(5), 386, 2003
平成15年度秋期第42回日本歯科理工学会学術講演会, H15/9/19-20, 盛岡市民文化ホール
- 22)Tae Sung Bae, Min Ho Lee, Dae Hee Won, Oh Sung Kwon, Il Song Park, Shoji Ohkawa, Fumio Watari: Characterization of Ca- and P-Enriched Anodized Ti-6Al-7Nb, 歯科材料・器械 22(5), 369, 2003
平成15年度秋期第42回日本歯科理工学会学術講演会, H15/9/19-20, 盛岡市民文化ホール
- 23)田村一央、高師則行、赤坂司、ロスカイオシフ、宇尾基弘、戸塚靖則、田路和幸、巨理文夫：カーボンナノチューブ、ナノ・マイクロ微粒子に対する生体反応、FGM2003 札幌講演概要集、6, 2003
第15回傾斜機能材料国内シンポジウム, H15/11/20-21, 北星学園大学（札幌市）
- 24)赤坂司、佐藤義倫、田路和幸、巨理文夫：糖鎖によるカーボンナノチューブの表面修飾、FGM2003 札幌講演概要集、39, 2003
第15回傾斜機能材料国内シンポジウム, H15/11/20-21, 北星学園大学（札幌市）
- 25)近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇尾基弘、巨理文夫：放電プラズマ焼結法で作製した窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの物性と生体適合性、FGM2003 札幌講演概要集、13, 2003
第15回傾斜機能材料国内シンポジウム, H15/11/20-21, 北星学園大学（札幌市）
- 26)宇尾基弘、赤坂司、巨理文夫：X線分析顕微鏡の生体内金属財郎及び周囲組織分析への応用、FGM2003 札幌講演概要集、41, 2003
第15回傾斜機能材料国内シンポジウム, H15/11/20-21, 北星学園大学（札幌市）
- 27)岩崎佳治、大川昭治、赤坂司、宇尾基弘、巨理文夫：純チタンと歯科用貴金属合金のレーザー溶接、FGM2003 札幌講演概要集、15,

- 2003
第15回傾斜機能材料国内シンポジウム,
H15/11/20-21, 北星学園大学(札幌市)
- 28)田村一央、ロスカ・イオシフ、宇尾基弘、
戸塚靖則、亘理文夫: サイズに依存したマイク
ロ・ナノ粒子の炎症誘導作用
Abst.51st Ann.Meet.JAPANESE ASSOCIATION
FOR DENTAL RESEARCH, 74, 2003
- 第51回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総
会・学術大会,
H15/12/1-2, 千里ライフサイエンスセンター
- 29)宇尾基弘、亘理文夫、谷和俊、森田学: コ
ンポジットレジ用蛍光性ガラスフィラーの作
製と応用
Abst.51st Ann.Meet.JAPANESE ASSOCIATION
FOR DENTAL RESEARCH, 73, 2003
- 第51回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総
会・学術大会,
H15/12/1-2, 千里ライフサイエンスセンター
- 30)ヤマダ・マギダ・キヨコ、宇尾基弘、大川
昭治、亘理文夫: レーザー照射した歯質の
SEM および共集点レーザー顕微鏡による表面
形状の定量解析
Abst.51st Ann.Meet.JAPANESE ASSOCIATION
FOR DENTAL RESEARCH, 114, 2003
- 第51回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総
会・学術大会,
H15/12/1-2, 千里ライフサイエンスセンター
- 31)赤坂司、亘理文夫、田村一央: カーボンナ
ノチューブを用いた培養基材の表面改質, 第2
5回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、
215, 2003
- H15/12/16-17, 大阪国際会議場
- 32)田村一央、高師則行、戸塚靖則、ロスカ・
イオシフ、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫: ナノ
・マイクロ微粒子バイオマテリアルの組織障害
の機序, 第25回日本バイオマテリアル学会大
会予稿集、216, 2003
- H15/12/16-17, 大阪国際会議場
- 33)Josif Daniel ROSCA, Fumio WATARI,
Motohiro UO, Tsukasa AKASAKA, Kazuchika
TAMURA: Biodegradable Polymer Microspheres
with Controlled Structure and Release Profile, 第
25回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、
233, 2003
- H15/12/16-17, 大阪国際会議場
- 34)亘理文夫: 微粒子と生体反応、第26回フ
ラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演
要旨集、5, 2004
- H16/1/7-9, 岡崎コンファレンスセンター
- 35)田村一央、高師則行、宇尾基弘、赤坂司、
田路和幸、戸塚靖則、亘理文夫: 炭素ナノ微粒
子の刺激によるマクロファージのサイトカイン
放出、第26回フラーレン・ナノチューブ総合
シンポジウム講演要旨集、78, 2004
- H16/1/7-9, 岡崎コンファレンスセンター
- 36)赤坂司、佐藤義倫、田路和幸、亘理文夫:
バイオ応用のための糖鎖によるカーボンナノチ
ューブの表面修飾、第26回フラーレン・ナノ
チューブ総合シンポジウム講演要旨集、166,
2004
- H16/1/7-9, 岡崎コンファレンスセンター
- 37)宇尾基弘、赤坂司、ロスカ・イオシフ、亘
理文夫、横山敦郎、大森守、佐藤義倫、田路和
幸: カーボンナノチューブの歯科・生体材料へ
の応用、第26回フラーレン・ナノチューブ総
合シンポジウム講演要旨集、115, 2004
- H16/1/7-9, 岡崎コンファレンスセンター
- 38)横山敦郎、山本悟、川崎貴生、野田坂佳伸、
向後隆男、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫、佐藤
義倫、田路和幸: カーボンナノファイバーに対
する組織反応、第26回フラーレン・ナノチ
ューブ総合シンポジウム講演要旨集、113, 2004
- H16/1/7-9, 岡崎コンファレンスセンター
- 39)古月文志、佐藤秀哉、野田坂佳伸、柴肇一、
進藤正信、西則夫、亘理文夫: 生体に優しい可
溶化カーボンナノチューブ、第26回フラーレ
ン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集、
34, 2004
- H16/1/7-9, 岡崎コンファレンスセンター
- 40)王蔚、近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇
尾基弘、亘理文夫、大森守: 多層カーボンナノ
チューブの固化の試み、平成15年度日本金属
学会日本鉄鋼協会両支部合同冬季講演大会概要
集、12, 2004
- H16/1/15-16, 北海道大学学術交流会館

- 41)朱禹赫、宇尾基弘、亘理文夫：電子レンジを用いたチタンの炭化、平成15年度日本金属学会日本鉄鋼協会両支部合同冬季講演大会概要集、25, 2004
H16/1/15-16, 北海道大学学術交流会館
- 42)赤坂司、佐藤義倫、田路和幸、亘理文夫：糖鎖によるカーボンナノチューブの表面修飾、第16回代用臓器研究会プログラム抄録集、7, 2004
H16/1/24, 北海道大学歯学部講堂
- 43)近藤英臣、横山敦郎、宇尾基弘、亘理文夫、川崎貴生：乾式合成法による窒化チタン/アパタイト系傾斜機能型インプラントの作製、第16回代用臓器研究会プログラム抄録集、7, 2004
H16/1/24, 北海道大学歯学部講堂
- 44)宇尾基弘、赤坂司、Rosca Iosif Daniel、亘理文夫：X線分析顕微鏡の生体内金属材料及び周囲組織分析への応用、第16回代用臓器研究会プログラム抄録集、4, 2004
H16/1/24, 北海道大学歯学部講堂
- 45)谷野之紀、比嘉昌、西村生哉、黒江敏史、亘理文夫、大畑昇、三田村好矩：各種支台築造法が歯質に及ぼす影響、第16回代用臓器研究会プログラム抄録集、6, 2004
H16/1/24, 北海道大学歯学部講堂
- 46)田村信太郎、上田康夫、二宮隆明、大畑昇、大井一浩、井上農夫男、亘理文夫：領域拡張法を用いた三次元CTデータからの頭蓋骨形態の抽出と実体模型の作製、第16回代用臓器研究会プログラム抄録集、6, 2004
H16/1/24, 北海道大学歯学部講堂
- 47)Iosif Daniel ROSCA, F.WATARI, M.UO, T.AKASAKA, K.TAMURA: Optical microscopic observation of the macroparticle formation in emulsification solvent evaporation method, 平成15年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会プログラム予稿集、7, 2004
H16/2/7, 北海道大学大学院歯学研究科講堂
- 48)宇尾基弘：X線分析顕微鏡による金属アレルギー患者の歯科修復物の迅速分析、平成15年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会プログラム予稿集、7, 2004
H16/2/7, 北海道大学大学院歯学研究科講堂
- 49)ヤマダ・マグダ・キヨコ、宇尾基弘、大川昭治、赤坂司、亘理文夫：走査型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いたレーザー照射歯質の非接触表面プロファイル解析、平成15年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会プログラム予稿集、8, 2004
H16/2/7, 北海道大学大学院歯学研究科講堂
- 50)亘理文夫：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、ナノメディシン研究成果発表会要旨集、29, 2004
平成15年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業 萌芽的先端医療技術推進研究 ナノメディシン研究成果発表会、
H16/2/18, (財)がん研究振興財団内国際研究交流会館(東京)
- 51)亘理文夫：「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」の課題、厚生労働科学研究補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業 ナノメディシン分野「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」(課題番号：H14-ナノ-021)平成15年度冬期・第4回研究発表会抄録集、
H16/2/19-20, 登別(登別グランドホテル)

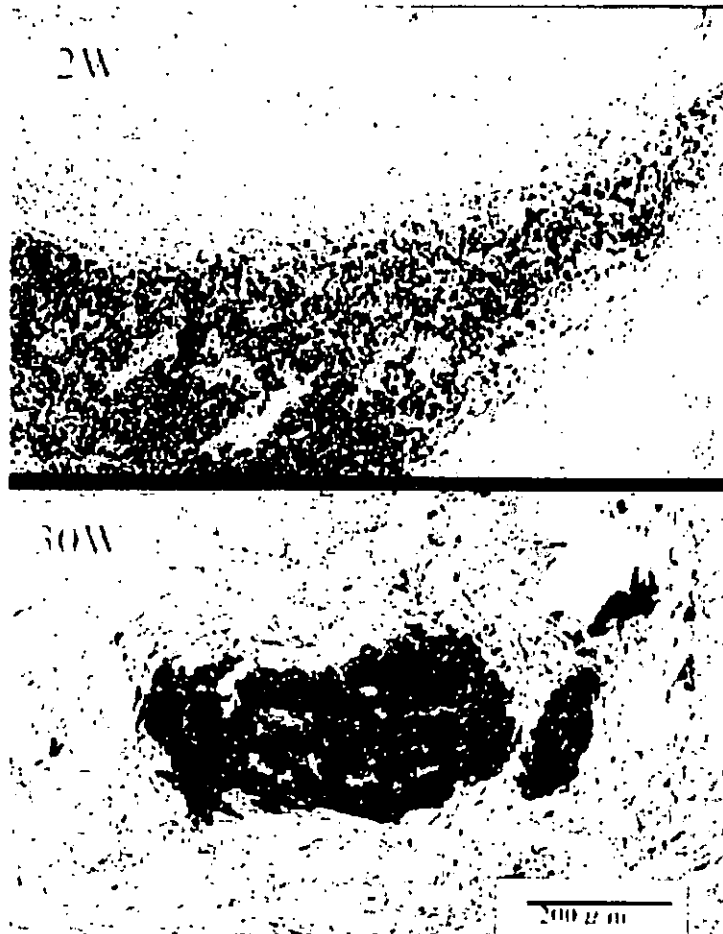


図1 3 μm Ti 微粒子を埋入した軟組織の経時変化(1 週後および 30 週後)。

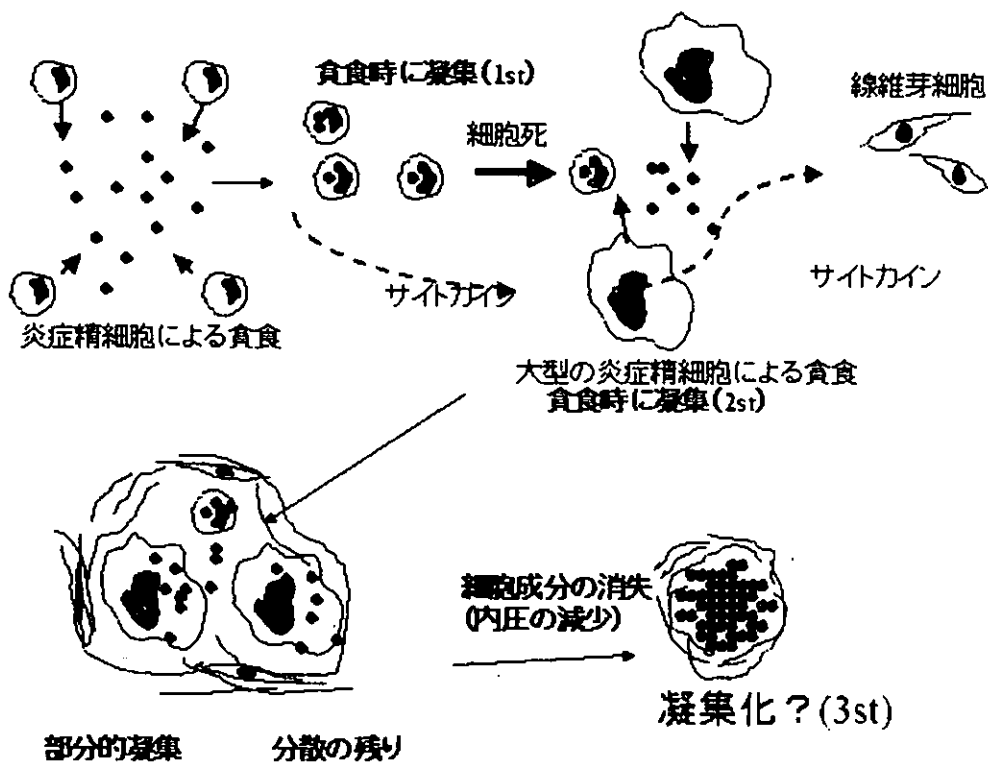


図2 Ti 微粒子に対する組織反応概念図

Superoxide anion

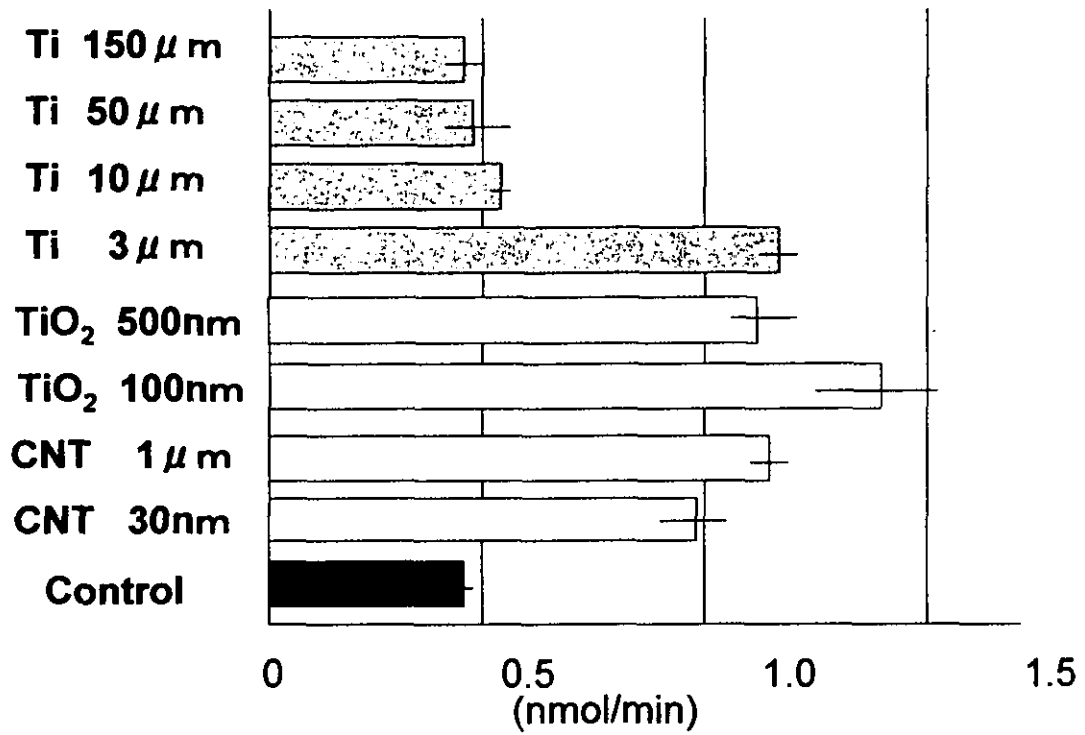


図3 ヒト好中球からの活性酸素産生量の各種微粒子サイズ依存性

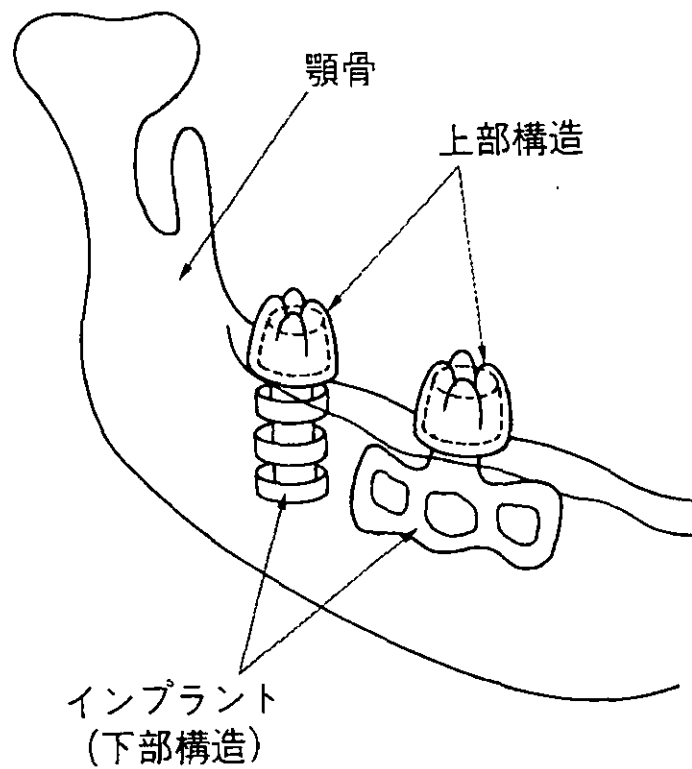


図4 デンタルインプラント (人工歯根) の概念模式図

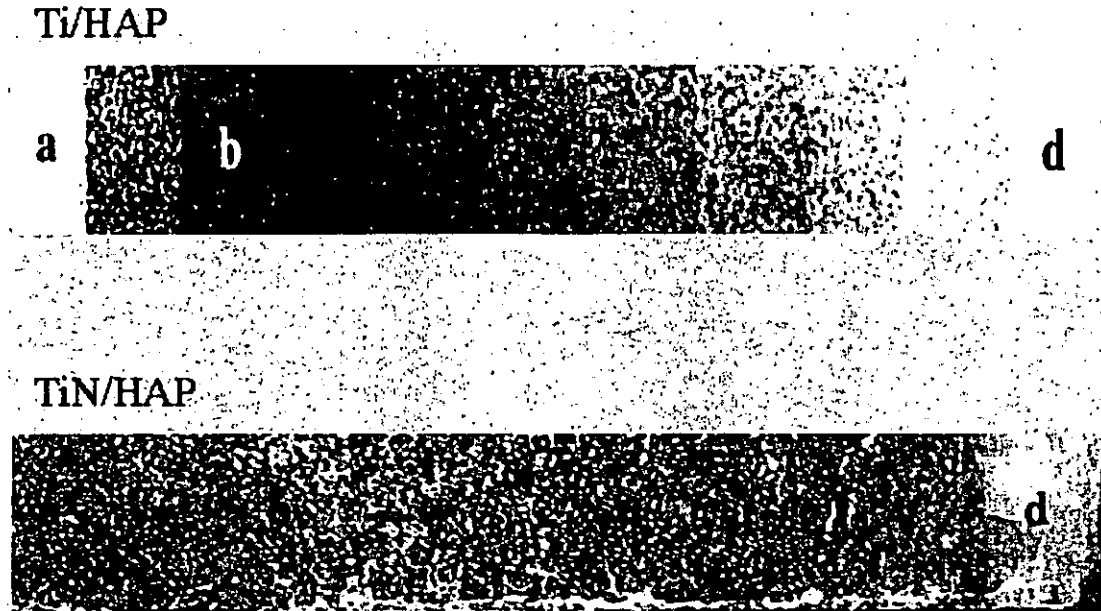


図5 Ti/HAP および TiN/HAP 傾斜機能型インプラント。
左から右端へ 10%ずつ 11 段階で HAP 含有量が増加している。

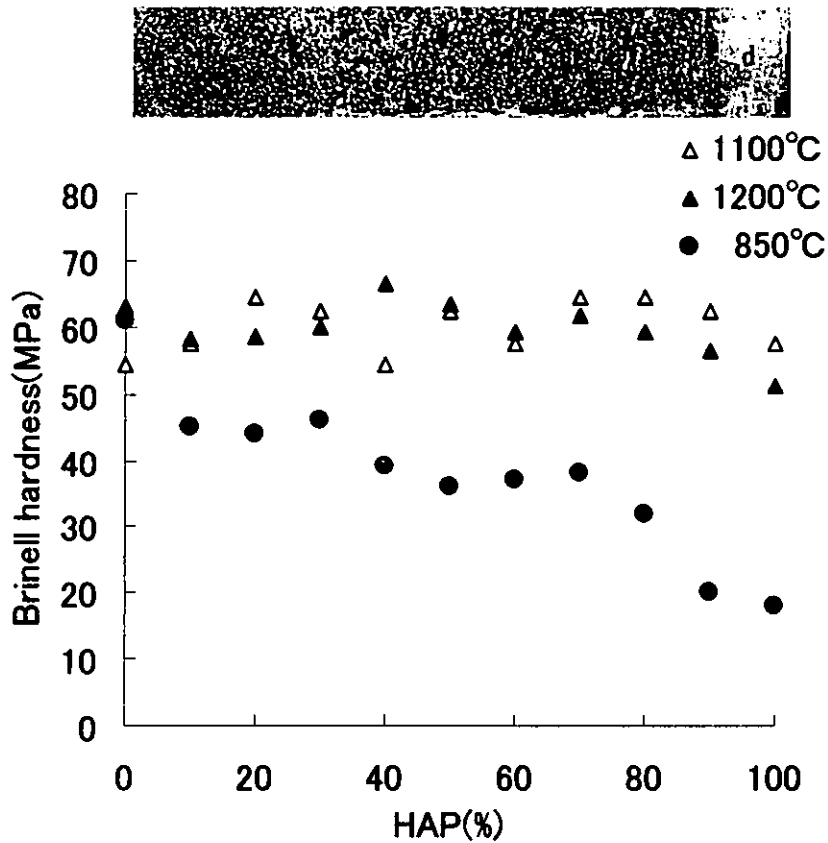


図6 Ti/HAP (焼結温度 850 ° C) および TiN/HAP (1100, 1200 ° C)
傾斜機能型インプラントの各部位におけるブリネル硬さ。

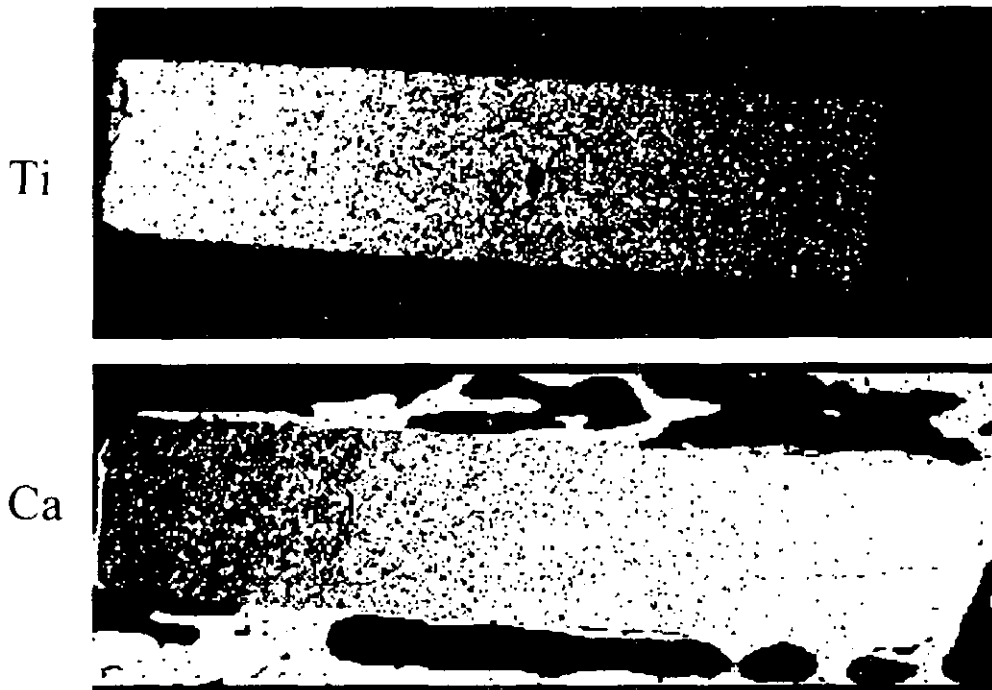


図7 ラット大腿骨骨髓腔に8週埋入後の TiN/HAP 傾斜機能型インプラント周囲組織の EPMA 元素マッピング像 (Ti 像、Ca 像)。インプラント内部の Ti, Ca の濃度傾斜とインプラント周囲の新生骨形成 (Ca 像) が認識できる。

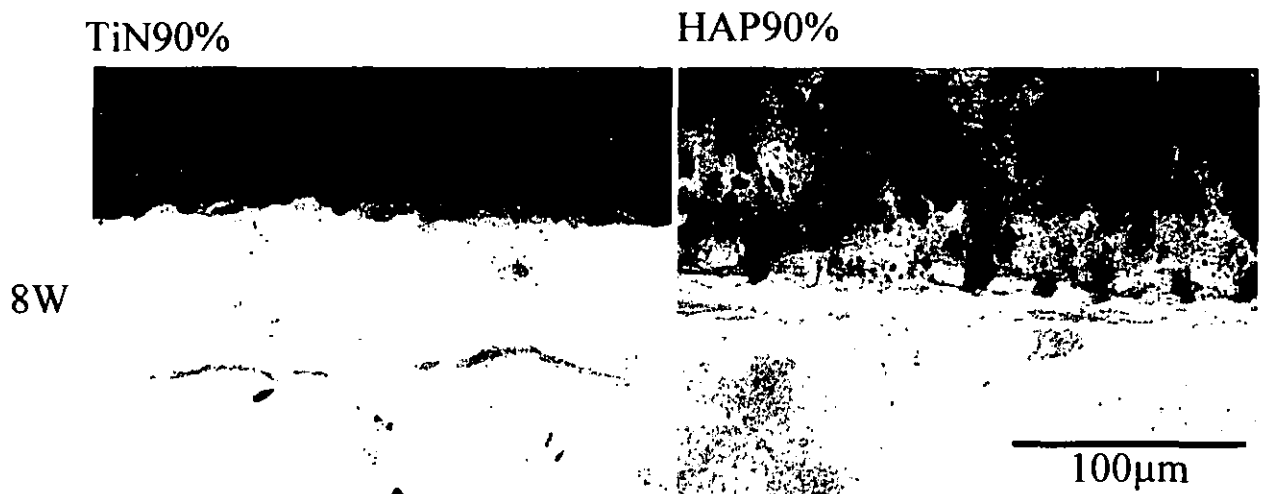


図8 ラット大腿骨骨髓腔に8週埋入後の TiN/HAP 傾斜機能型インプラント周囲の新生骨形成 (それぞれ TiN, HAP 高濃度部)。

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)
分担研究報告書

カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用

| | | | |
|-------|-------|------------|------|
| 分担研究者 | 亘理文夫 | 北海道大学歯学研究科 | 教授 |
| 研究協力者 | 赤坂 司 | 北海道大学歯学研究科 | 助手 |
| 研究協力者 | 宇尾基弘 | 北海道大学歯学研究科 | 助教授 |
| 研究協力者 | 佐々木紘子 | 北海道大学歯学研究科 | 大学院生 |
| 研究協力者 | 青木尚志 | 北海道大学歯学研究科 | 大学院生 |
| 研究協力者 | 田村一央 | 北海道大学歯学研究科 | 大学院生 |

研究要旨 カーボンナノチューブ (CNT) は近年最も注目されている材料の1つであり、バイオ分野での応用研究も開始されつつある。本研究では CNT のバイオ分野でのさらなる展開を目指し、バイオ研究を行うために CNT のろ過膜や歯質等への固定化法や新たなる機能を付与するための CNT の糖鎖またはアパタイトによる表面修飾を検討した。

MWCNT を分散溶液とし、吸引ろ過装置を用いて各種ろ過膜へ固定化を達成できた。また、生体材料のひとつとして酸処理した歯質スライスを MWCNT 分散液に浸したところ、象牙質に対して MWCNT の選択的な吸着が観察され、歯質表面への固定化が達成された。

糖鎖機能を付与するため、MWCNT に対して人工糖質高分子を混ぜたところ、人工糖質高分子は MWCNT 表面へ密に吸着し、表面修飾が容易に達成できることが判明した。特にポリスチレン型の人工糖質高分子は表面に強く吸着し、また糖鎖が密に存在するためタンパク質の非特異吸着を抑制した。それにより、ポリスチレン型の表面に存在する糖鎖の機能としては相当するレクチンにより選択的に認識され、正常に発現することが分かった。次に、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ところ、MWCNT をコアとした結晶物の析出が観察され、容易に表面修飾が可能であることが分かった。

1. カーボンナノチューブの固定化

A. 研究目的

カーボンナノチューブ (CNT) は炭素原子の6員環ネットが円筒状に閉じた直径がナノメー

トルスケールの中空チューブであり、近年最も注目されている材料の1つである。その特異な形状や電気的性質などから現在ではエレクトロニクス分野やエネルギー分野を中心とした