

Fig. 1-7 Young's modulus E_{SP} of SWCNT solids as a function of sintering temperature.

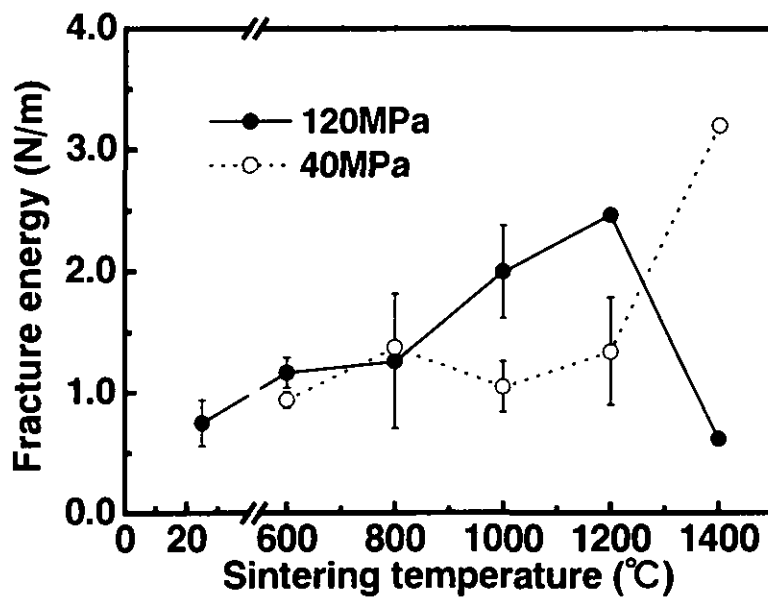


Fig. 1-8 Fracture energy G_{SP} of SWCNT solids as a function of sintering temperature.

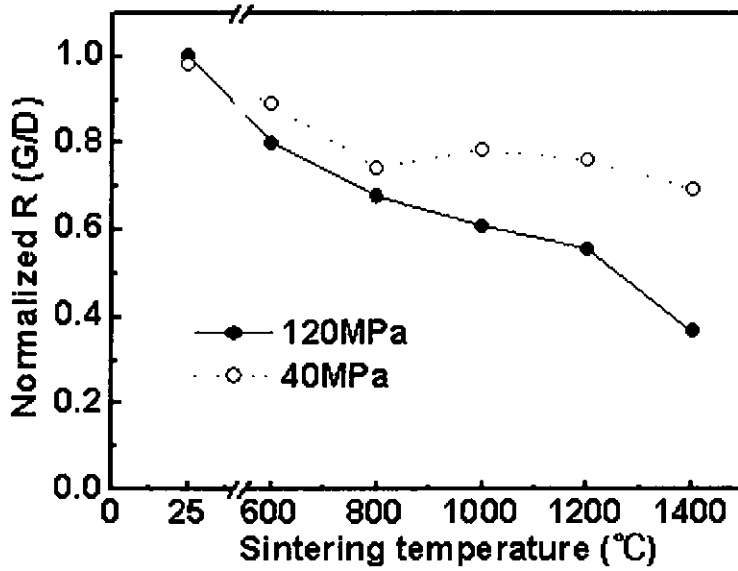


Fig. 1-9 Normalized R(G/D) of SWCNT solids as a function of sintering temperature.

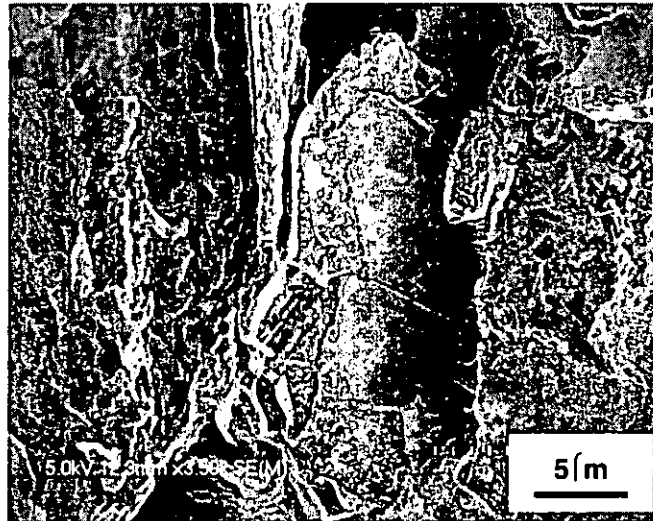


Fig. 1-10 SEM image of graphite-like materials. (sintering pressure : 120MPa, sintering temperature : 1200°C)

Table 2-1 Ti表面処理条件

Name	Finish	Temp.	Time	600°Cheat
A	#1500	150°C	2hrs	No
B	#80	150°C	2hrs	No
C	#80	60°C	24hrs	1h
Ref.	#1500	-	-	-

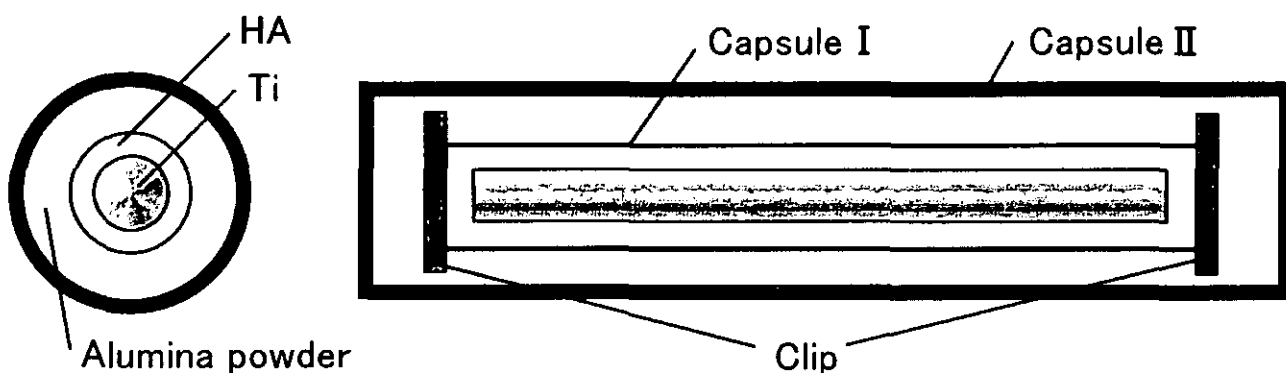


Fig.2-1 二重カプセルの構造概略図

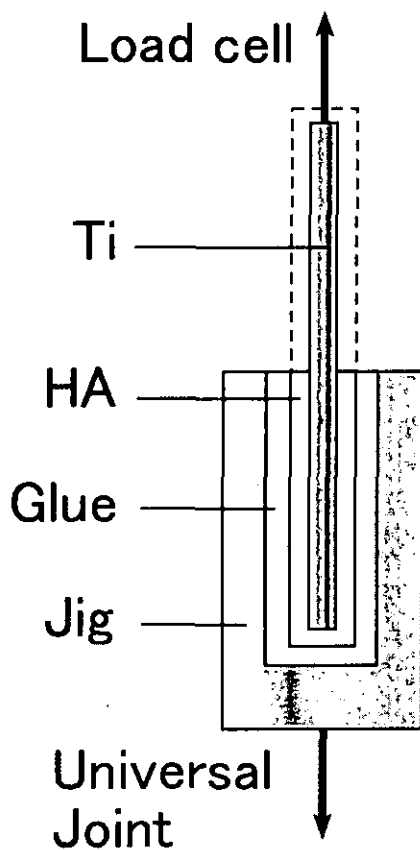


Fig. 2-2 引抜試験片の概略図

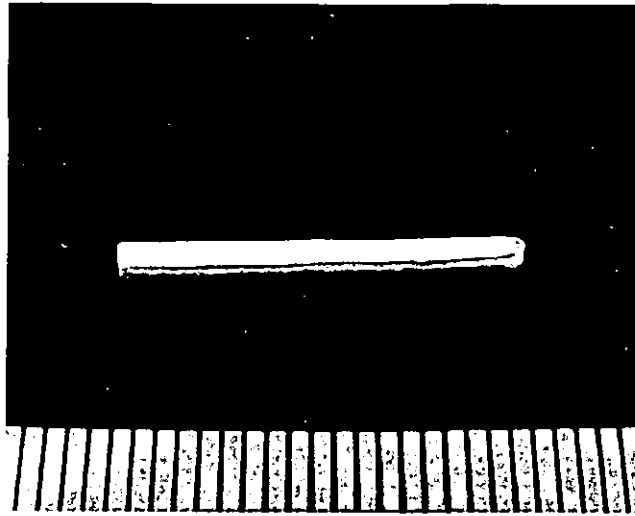


Fig.2-3 カプセルから取り出したHAコーティング試料(直径1.5×20mm, 膜厚さ約50 μ m)

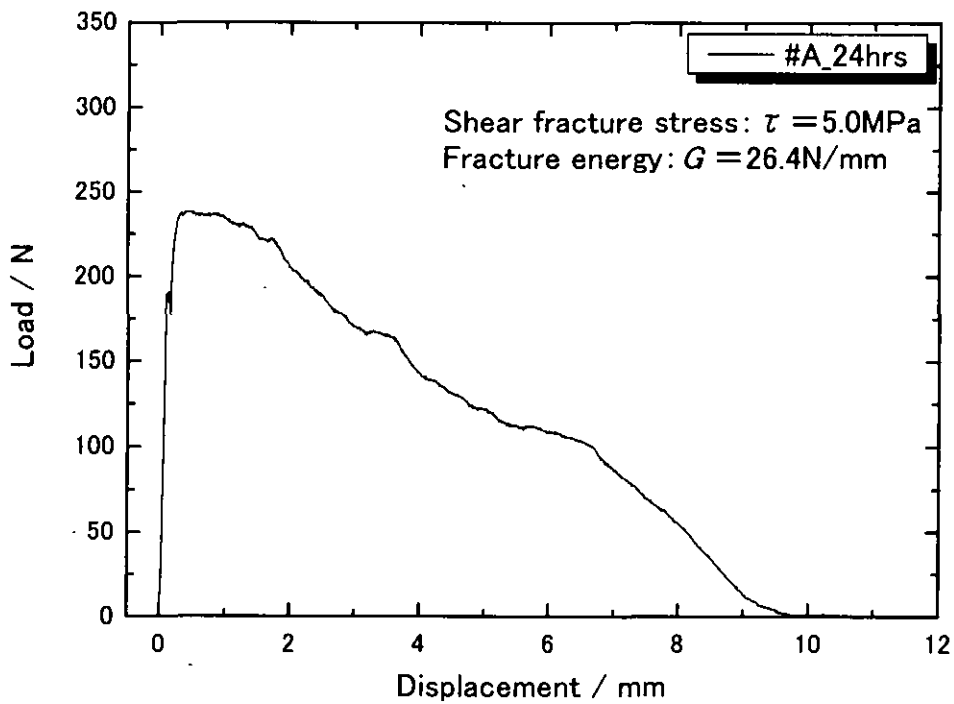


Fig. 2-4 荷重-変位曲線の例 (表面処理A, 40MPa, 135°C, 24hours)

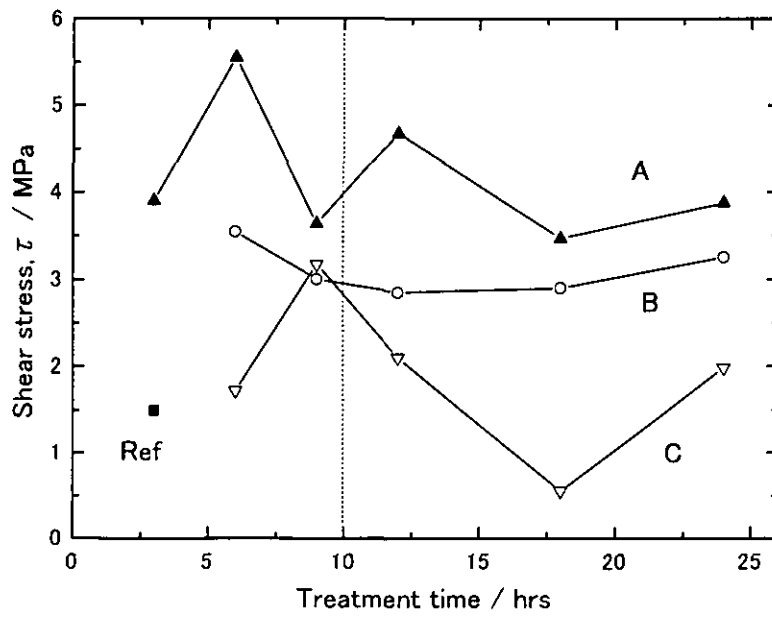


Fig.2-5 それぞれのTi表面処理材のせん断強度とオートクレーブ処理時間の関係

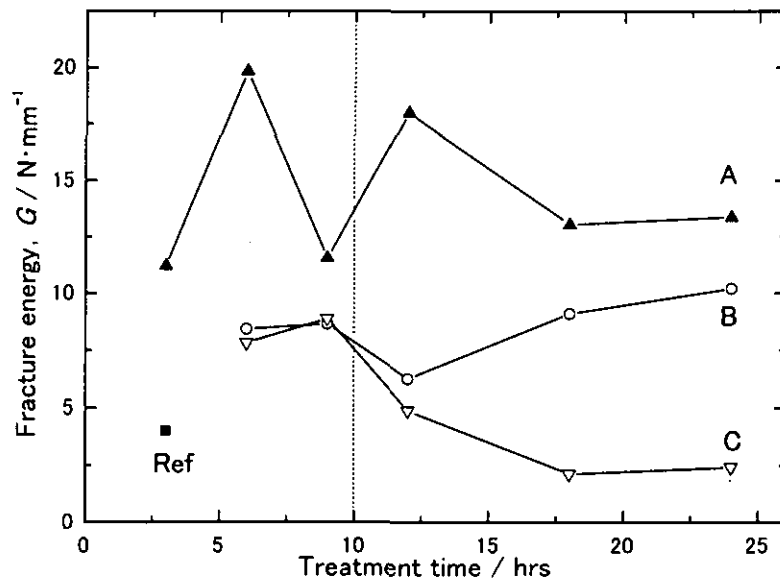


Fig.2-6 それぞれのTi表面処理材の界面破壊エネルギーとオートクレーブ処理時間の関係

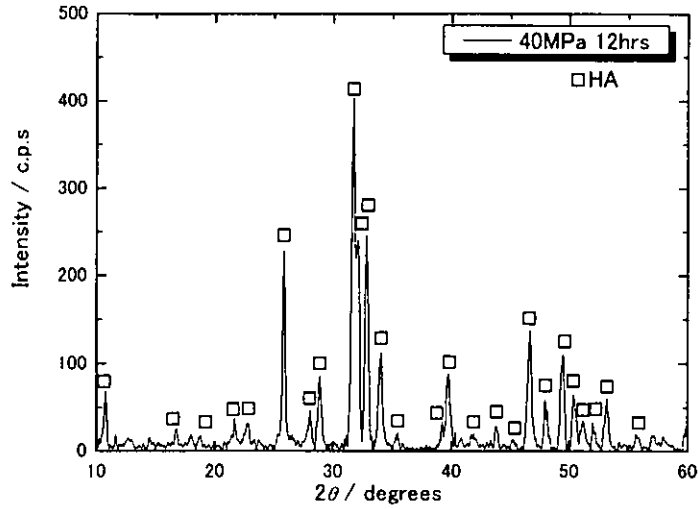


Fig.2-7 HAコーティングのXRDパターン(40MPa, 135°C, 12hours)

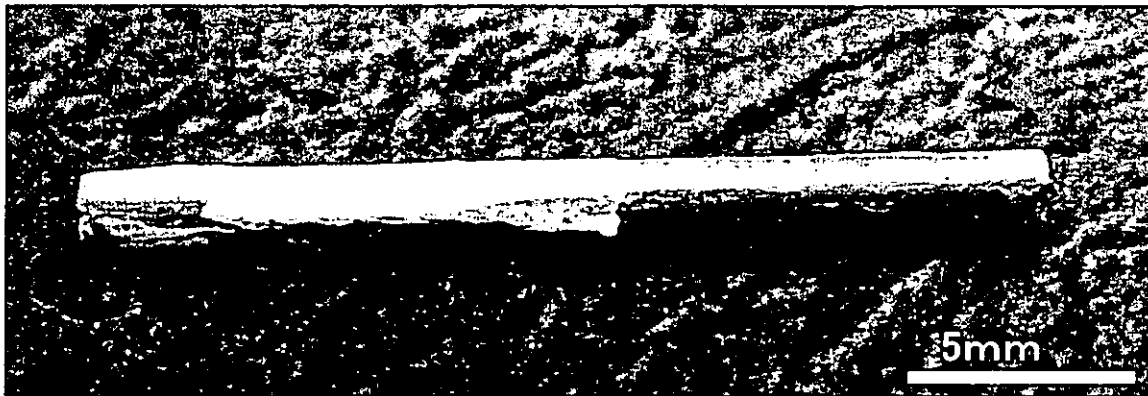


Fig.2-8 引抜試験後の試験片(表面処理A, オートクレーブ処理24時間)

Table 2-2 Ti表面処理におけるせん断強度とき裂進展経路

Name	Finish	Temp.	Time	600°Cheat	τ (24hrs)	Crack path
A	#1500	150°C	2hrs	No	4.2MPa	HA
B	#80	150°C	2hrs	No	3.1MPa	Interface
C	#80	60°C	24hrs	1h	1.7MPa	Interface
Ref.	#1500	-	-	-	*1.5MPa	Interface

*オートクレーブ処理2時間のデータ

分担研究報告書

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

分担研究者	川崎貴生	北海道大学歯学研究科教授
分担研究者	横山敦郎	北海道大学附属病院講師
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
研究協力者	山本悟	北海道大学附属病院助手
研究協力者	王蔚	北海道大学歯学研究科大学院生
研究協力者	青木尚史	北海道大学歯学研究科大学院生
研究協力者	佐々木紘子	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 本研究においてはナノ微粒子の生体材料への応用を最終的な目的とするが、本年度においてはナノチューブおよびナノファイバーなどのナノ微粒子に対する *in vivo* での組織反応を検索するとともに、細胞培養担体としての可能性を検討するため *in vitro* における反応を検索した。材料として、多層カーボンナノチューブおよびカーボンナノファイバーを用いた。 *in vivo* においてはラットの皮下組織に埋入後、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて観察した。 *in vitro* においては、骨芽細胞様細胞を用いて多層カーボンナノチューブを吸着させた膜上で培養した。 *in vivo* において、いずれの材料も壊死などの強い炎症反応は生じなかったが、カーボンナノファイバーは、マクロファージに貪食されることが多かったのに対し、多層カーボンナノチューブは、貪食されたものはほとんど認められなかった。 *in vitro* においては、多層カーボンナノチューブを吸着させた膜上で培養した場合のほうが、骨芽細胞様細胞の増殖は速いこと、細胞の増殖は基盤となる膜の性状に影響を受けることおよび細胞と多層カーボンナノチューブは強固に結合していることが示された。以上の結果から、ナノ微粒子の生体適合性が示され、生体材料への応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

再生医療や遺伝子治療など新しい医療技術の発展は、国民の健康・福祉の向上に寄与す

るのみならず、治療効果を高めることにより、医療費の削減が可能となり経済的な面からも広く社会へ貢献するものと考えられる。新しい

医療技術の発展には、生体材料の開発および研究は必須であり、これらの技術は関連する他の分野においても新たな産業を興すものと期待される。

このような状況を鑑み、我々は昨年より、カーボンナノチューブに代表されるナノ微粒子の生体材料への応用に取り組んでいる。我々の最終的な目標は、これらのナノ微粒子をドラッグデリバリーシステム (DDS) のキャリアや再生医療の際の細胞のスキャホールドへの応用であり、昨年度は主としてカーボンナノファイバーの *in vivo* における組織反応を検索し、強い炎症反応は生じないことを明らかにした。本年度においては、*in vivo* での反応をさらに詳細に検討するとともに、細胞培養担体としては再生医療用のスキャホールドの開発を目的とした *in vitro* での反応を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

1) *in vivo* 実験用試料

(1) カーボンナノファイバー(CNF)：化学蒸着法により合成し、酸処理にて触媒金属を除去したカーボンナノファイバーを用いた。

(2) 多層カーボンナノチューブ(CNT)：NanoLab 社製、純度 80%のものを用いた。

(3) CNT-HAp：CNT を放電プラズマ焼結法 (SPS 法) を用いて、120MPa、120℃、Phenol resin30%で焼結後、PVD 法で Ti コーティングを施し、角柱に切り出した後、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 5 μ m 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℃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

多層 CNT(NanoLab 社製)に重量比で、5%、15%、25%の polycarbosilane を混合し、焼結圧 120MPa、焼結温度 1200℃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)。

2. 方法

1) 動物埋入実験

CNF, CNT については 6 週齢雄性ウイスター系ラットを、CNT 固化体については 8 週齢の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、試料を埋入、縫合した。CNT-HAp については、14 週齢雄性ウイスターラットの大腿骨に形成した骨欠損部から骨髓腔に埋入した。埋入後、CNF, CNT については 1 および 4 週後に Pentobarbital Sodium による全身麻酔後、灌流固定を行い周囲組織とともに摘出し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて観察した。CNT 固化体については、1 および 2 週後に周囲組織とともに摘出し、浸漬固定を行い、光学顕微鏡にて観察した。CNT-HAp については、

埋入 6 週後で大腿骨とともに摘出し、非脱灰のまま樹脂包埋を行い、研磨標本作製し、光学顕微鏡で組織学的に観察すると同時に、電子線プローブマイクロアナライザー (EPMA) にて元素分析を行った。

2) *in vitro* 細胞培養

CNT+PTFE 膜および CNT+PC 膜を 6 cm polystyrene dish に置き、ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞である Saos2 を 1.5×10^6 個播種した。10%牛胎児血清および抗生剤を添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用い 37℃、5%CO₂の気相下で培養した。培養3日後の細胞数を SEM 写真上にて測定した。また 10 および 20 日後、SEM にて観察した。

(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) *in vivo* での生体反応について

(1) CNF について

1 週後、試料集塊は、比較的薄い線維性結合組織の被膜で覆われていた。CNF 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。これらの貪食系細胞の細胞質内にも、CNF の小さな粒子が観察された(Figs 1 and 2)。壊死や好中球の浸潤などの強い炎症反応は観察されなかった。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食された CNF 粒子が観察された(Fig. 3)。CNF の粒子の多くは、膜に覆われており、ライソソ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. 4)。CNF 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。

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ていた。CNF 粒子周囲には、間葉系の細胞や異物巨細胞が多数観察され、いわゆる肉芽腫性炎の状態を呈していた(Figs 5 and 6)。TEM による観察において、

1 週後に比較し CNF 粒子の凝集の程度は弱くなり分散する傾向を示した (Fig. 7)。CNF を取り囲むライソソームの膜は、1 週後に比較しほとんど観察されなかった (Fig. 8)。また、4 週後に特徴的な像として、内部の透過性が強い CNF が観察された (Fig. 9)。

(2) CNT について

1 週後、CNT 塊は肉芽組織に被包されており、CNT 周囲には多くのマクロファージや異物巨細胞が観察されたが、周囲組織には好中球の浸潤や壊死組織などは観察されなかった(Figs 10 and 11)。4 週後では、CNT 塊は線維性結合組織に被包されていたが、CNT 周囲には多数のマクロファージや異物巨細胞が残存しており、肉芽腫性炎の状態を呈していた(Figs. 12 and 13)。TEM 観察では、CNT は凝集しており、周囲にはマクロファージや異物巨細胞が認められ、これらの細胞は CNT 塊に接してはいるものの貪食している像はほとんど観察されなかった (Figs 14 and 15)。また、幅 5nm 程度の CNT と考えられる線状の構造が強拡大像にて観察された (Fig. 16)。

(3) CNT-HAp について

CNT-HAp は、骨髓腔の中央に認められた(Fig. 17)。CNT の表層の多くの部分には、一層の新生骨が直接接しているのが観察された(Fig. 18)。

(4) CNT 固化体について

①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固化体

結合材を含まない固化体は、細胞成分の多い比較的密な線維性結合組織に被包されていた。結合組織内には間葉細胞や線維芽細胞が多数観察され、一部の材料表面には、異物巨細胞が認められた (Fig. 19)。phenol resin を含む固化体は、やや厚い線維性結合組織により被包されていた。結合組織内の細胞および毛細血管は、

含まない固化体に比較し多く、50%phenol resinを含む固化体周囲には、リンパ球が観察され、phenol resinの含有量が多いほうが、材料周囲の炎症反応は強い傾向を示した(Fig. 20)。

②polycarbosilaneを結合材として用いた固化体について

polycarbosilane (PCS)のみの埋入においては、PCSがある程度の大きさの場合は、疎性な線維性結合組織に被包されていたが、細片の場合には、間葉細胞、線維芽細胞および毛細血管を多数含む比較的密な肉芽組織に覆われ、PCS表面には多数の異物巨細胞が観察された。壊死や好中球の浸潤などの強い炎症反応は観察されなかった(Figs. 21 and 22)。CNTの結合材としてPCSを用いた場合、phenol resinと同様に、PCSの濃度が高くなると周囲組織の炎症は強くなる傾向を示したが、phenol resinを用いた場合と比較し炎症の程度の差は明瞭ではなかった(Fig. 23 and 24)。

2) *in vitro* 試験

(1) CNT+PTFE膜について

培養3日後、CNT+PTFE膜上では細胞の伸展が認められたが、対照であるPTFE膜上では伸展している細胞はほとんど観察されなかった(Figs 25 and 26)。細胞数はCNT+PTFE膜で 2.1×10^5 個に対してPTFE膜では 7.1×10^4 であり、約2.9倍の値を示した(Fig. 27)。10日後においても、対照であるPTFE膜上では、伸展している細胞は少なく、細胞数もCNT+PTFE膜に比較し少ない傾向を示した(Fig. 28 and 29)。培養20日後では、伸展していた細胞は一部で重層化し、結節を形成していた。細胞表面には、顆粒状の構造が認められたが、EDXにおいては、CaやPは検出されなかった(Fig. 30)。

(2) CNT+PC膜について

培養3日後、CNT+PC膜上で細胞の伸展がみ

られたが、対照であるPC膜上では、伸展している細胞はほとんど認められなかった(Figs. 31 and 32)。細胞数もPCは 4.2×10^4 であったが、CNT+PC膜は 1.82×10^5 個であり、約4.3倍の値を示した(Fig. 27)。10日後においても、PC膜上培養では、CNT+PC膜に比較すると細胞数および伸展の程度は少ない傾向を示した(Fig. 33 and 34)。

培養20日後では、CNT+PC膜上で細胞はさらに伸展しており、細胞の突起とCNTとの接触を示唆する像も認められたが、CNT+PTFE膜でみられた細胞の重層化や結節の形成は認められなかった(Fig. 35 and 36)。

D. 考察

1) *in vivo* 埋入試験の結果について

CNFについては、変性や壊死などの強い炎症反応は起こさず、貪食系の細胞にある程度凝集した大きさであっても貪食されることが示唆された。埋入1週間においては、ライソゾームと考えられる膜構造が周囲に認められるCNFが多かったが、4週間において膜構造はほとんど観察されなかった。また、4週間では、凝集しているCNFが分散している像が観察されたことから、ライソゾームがCNFの分散に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。

CNTについては、マクロファージや異物巨細胞に近接するものの貪食されている像はほとんど観察されなかった。これは、使用したCNTが凝集し、形態的にも大きさ的にも貪食されづらかったためと推察された。今回使用したCNTは、純度80%であるため、夾雑物が凝集に影響している可能性が示唆された。現在、純度を高めたCNTについて、埋め込み実験を行っている。

CNT-HApについては、炎症反応はほとんど観察されず、良好な組織適合性を示した。初年

度において、phenol resin を含む CNT 固化体に Ti を被覆した試料は、骨との適合性に問題のあることが示された。今回この試料に水熱ホットプレス法で HAp をコーティングした場合、骨との適合性が改善したことから、この水熱ホットプレス法による HAp の CNT 固化体へのコーティングは有効であることが示された。しかし、埋入操作時に HAp コーティングの剥離が生じたことから、コーティング層の薄膜化や強度の向上が望まれる。

CNT 固化体に対する生体反応であるが、結合材を含まない固化体において軽微な炎症が認められたが、これは固化体の表面性状および固化体からの細粉の散逸が推察された。しかし、埋入初期の反応としては軽微であり、十分な生体適合性を有するものと考えられる。

phenol resin (PR), polycarbosilane (PCS) とともに CNT の結合材として用いて固化体を作製し皮下組織に埋入した場合、含有濃度に応じて周囲組織に炎症を惹起することが示された。これは、PR のみの埋入実験は行っていないが、PCS のみの埋入結果から、結合材そのものに起炎性があり、CNT と複合し SPS で焼結した後も固化体表面に結合材の反応物が残存し、炎症を惹起することが示唆された。また、PCS のみ埋入した場合と比較し、固化体のほうが炎症は軽微であったことは、CNT との複合により起炎性に影響はなく、PCS 反応物の濃度が低くなったためと推察されるが、CNT と PCS や PR との密度の差は大きく、結合材の濃度と炎症程度の関係も含めて今後の検討を要するものと考えられる。

今回の実験においては、PCS と PR との埋入期間および焼結条件が異なることから、結合材の濃度が同じであっても単純な比較はできないが、埋入 2 週の PCS における炎症の程度は埋入 1 週の PR より軽度なことから、PCS の起炎

性は PR と同等か低いことが示唆された。

2) *in vitro* 細胞培養試験の結果について

CNT を吸引濾過によりコーティングした PTFE 膜および PC 膜上で骨芽細胞様細胞である Saos2 を培養した場合、コーティングしていない膜上で培養した場合と比較し、細胞の増殖および伸展は速い傾向を示した。この理由として、CNT のコーティングによる膜の表面構造の変化や CNT への血清タンパクの吸着が考えられる。SEM 像において、CNT 表面に顆粒状の物質が認められたことから CNT 表面への吸着の可能性が強く示唆された。CNT へのタンパクの吸着は、現在非常に注目されている事象であり、ナノ微粒子の生体材料への応用に際して、今後さらなる検討が必要であろう。また、トリプシン処理を行った後も、剥離されない細胞が多数認められた。これらの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ている像を示しており、これらについても今後さらなる研究を進めていく必要がある。

E. 結論

ナノ微粒子の *in vivo* および *in vitro* での組織反応を検索することを目的として、動物埋入実験および細胞培養実験を行い、以下の結論を得た。

1. カーボンナノチューブ (CNF) およびカーボンナノファイバー (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。
2. 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。
3. 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 polycarbosilane 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。

4. 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に比較し、骨芽細胞の増殖は促進された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) R.Fujita, A.Yokoyama, T.Kawasaki, T.Kohgo. Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate blocks. J Oral Maxillofac Surg 61:1045-1053,2003

2) R. Fujita, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Kohgo, T. Kawasaki. Ultrastructure of ceramic-bone interface using hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate in bone. Tissue & Cell 35:427-440. 2003

3) 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 巻 837-842. 2003

4) F.Watari, Y.Tamura, A.Yokoyama, M.Uo, T.Kawasaki. Mechanical properties and biocompatibility of surface-nitrided titanium for abrasion resistant implant. Bioceramics 16:873-876. 2003.

2. 学会発表

1) 横山敦郎, 山本悟, 赤坂司, 野田坂佳伸, 進藤正信, 向後隆男, 川崎貴生, 古月文志, 佐藤義倫, 田路和幸, 小野木伯薫, 橋田俊之, 大森守 カーボンナノチューブの生体材料への応用 *in vivo* および *in vitro* でのカーボンナノチューブに対する反応 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 15 年度夏期第 3 回研究発表会抄録集, 2003

2) 横山敦郎, 川崎貴生, 野田坂佳伸, 向後隆男 カーボンナノチューブに対する組織反応 第 110 回日本補綴歯科学会学術大会, 補綴誌 47 巻特別号 175, 2003

3) 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

4) 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 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

5) 青木尚史, 佐々木紘子, 王蔚, 山本悟, 横山敦郎, 川崎貴生, 野田坂佳伸, 進藤正信, 向後隆男, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理文夫, 佐藤義倫, 田路和幸 カーボンナノチューブの生体材料への応用細胞培養担体としての応用 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 年度冬季第 4 回研究発表会抄録集, 2004

6) 横山敦郎, 山本悟, 王蔚, 青木尚史, 佐々木紘子, 川崎貴生, 野田坂佳伸, 向後隆男, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理, 佐藤義倫, 田路和幸, 大森守 カーボンナノチューブの生体材料への応用 *in vivo* での CNT 固化体に対する反応- 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 15 年度冬季第 4 回研究発表会抄録集, 2004

7) 佐々木紘子, 青木尚史, 横山敦郎, 川崎貴生, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理文夫, 佐藤義倫, 田路和幸 カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用—単層カーボンナノチューブの柔軟性を探る—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 年度冬季第 4 回研究発表会抄録集, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

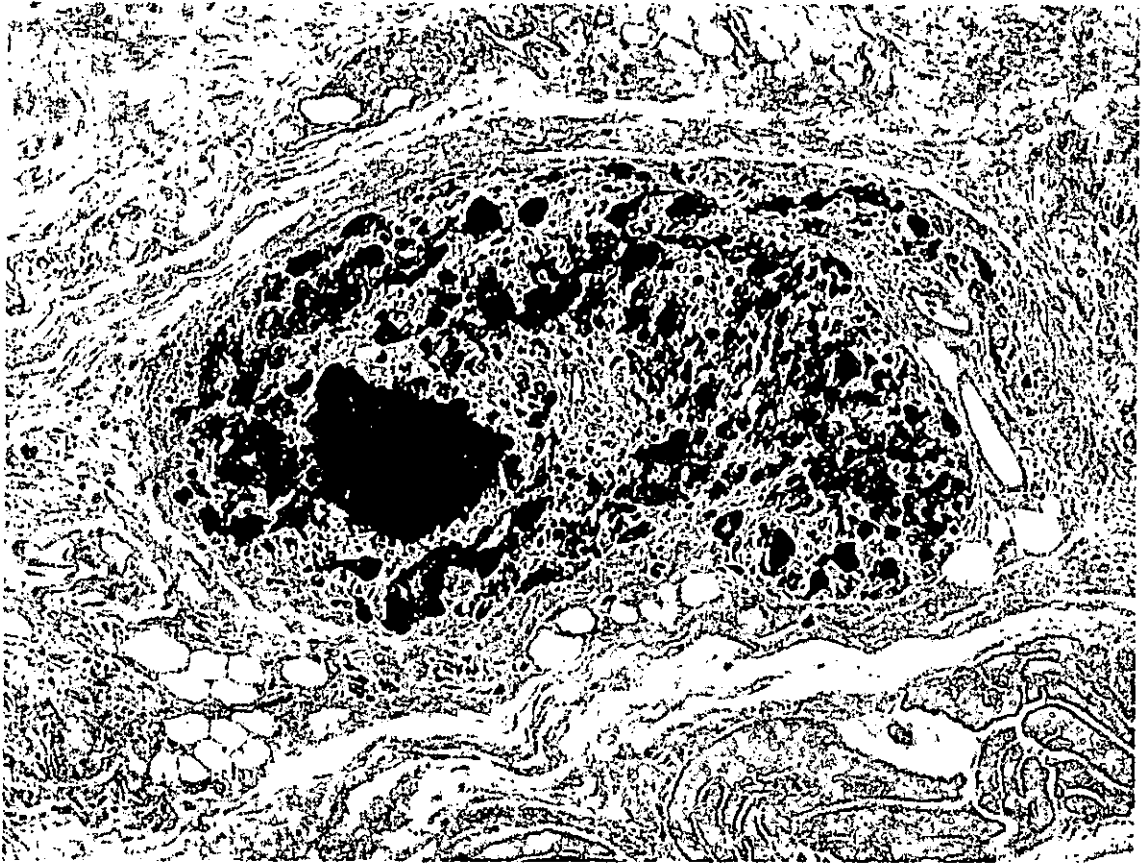


Fig. 1

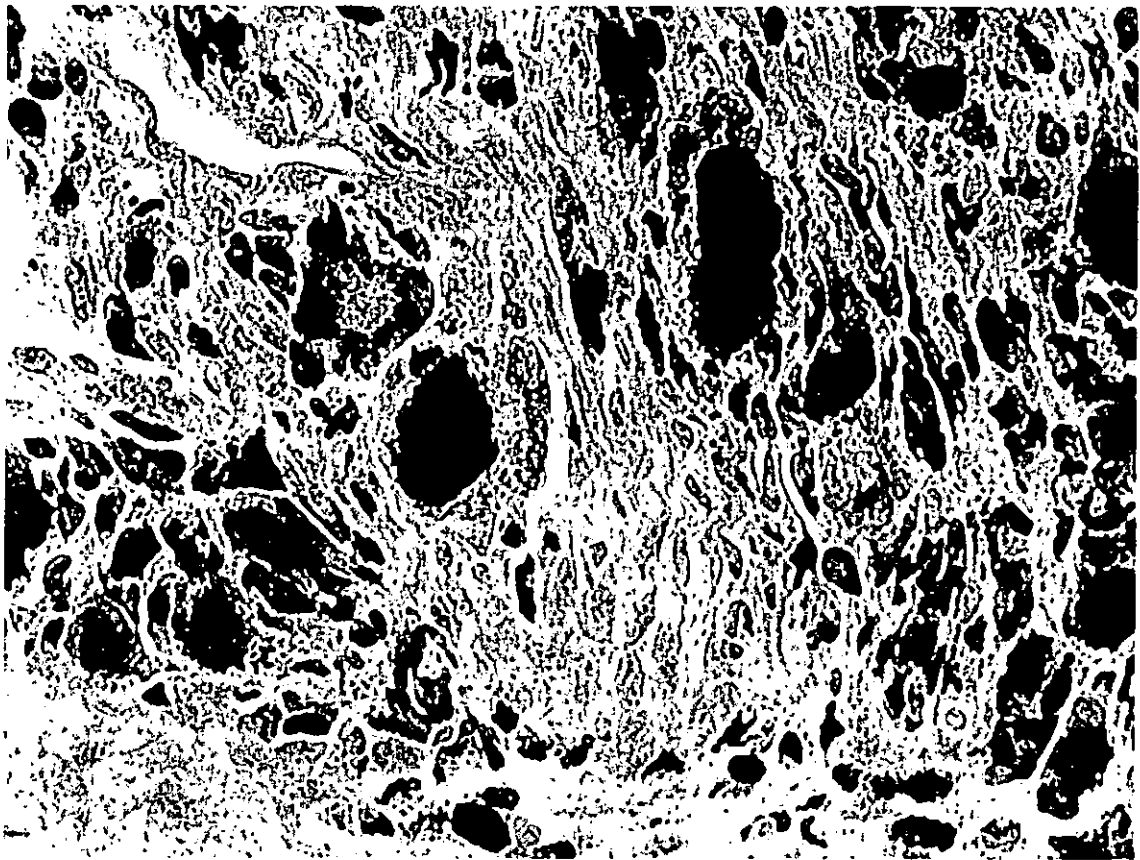


Fig. 2

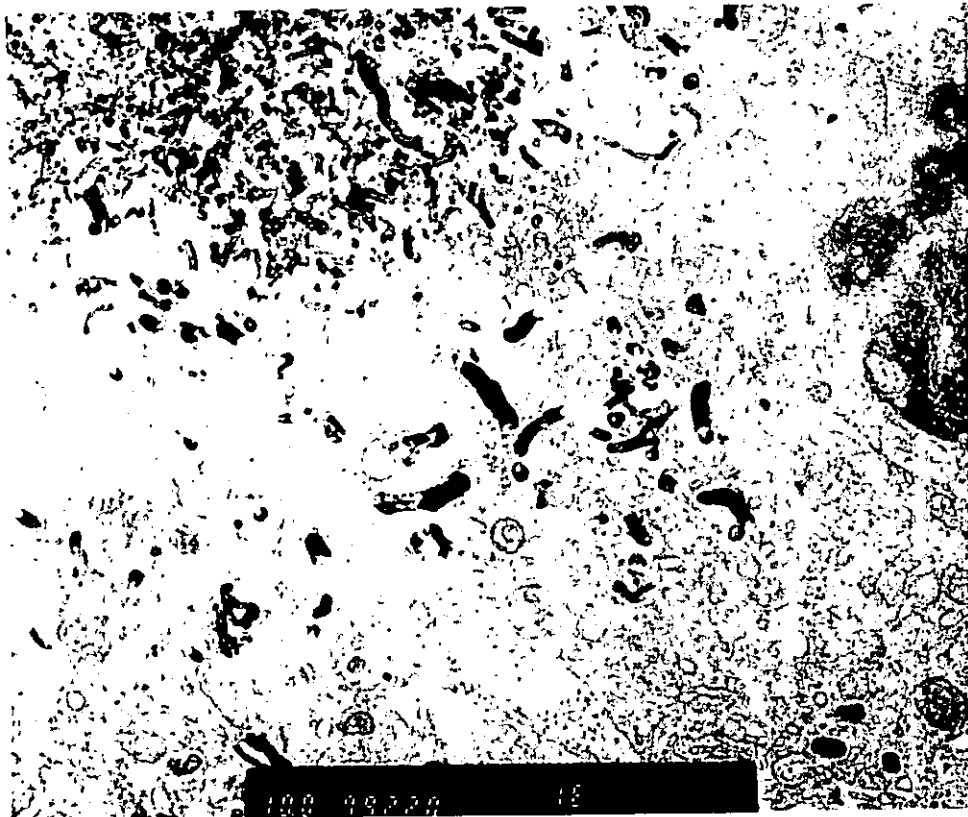


Fig. 3



Fig. 4

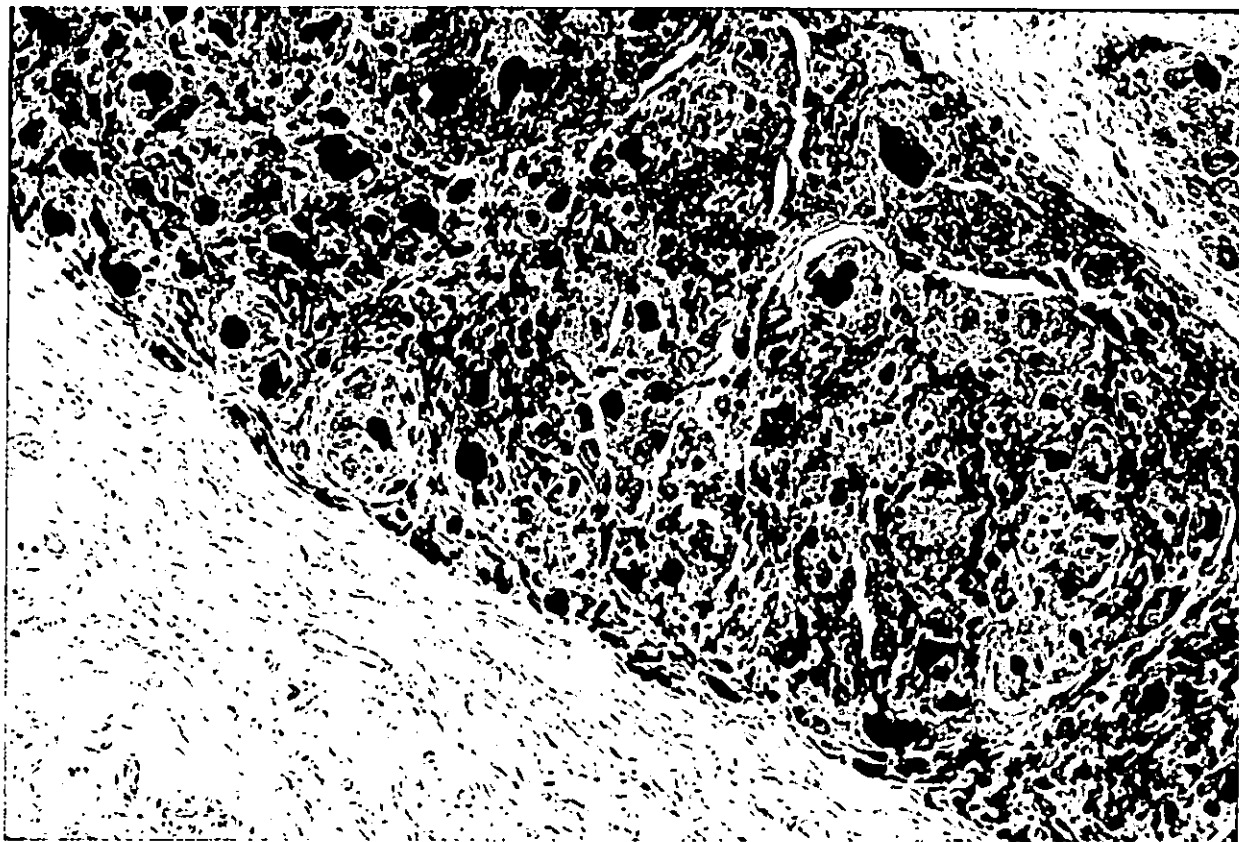


Fig. 5

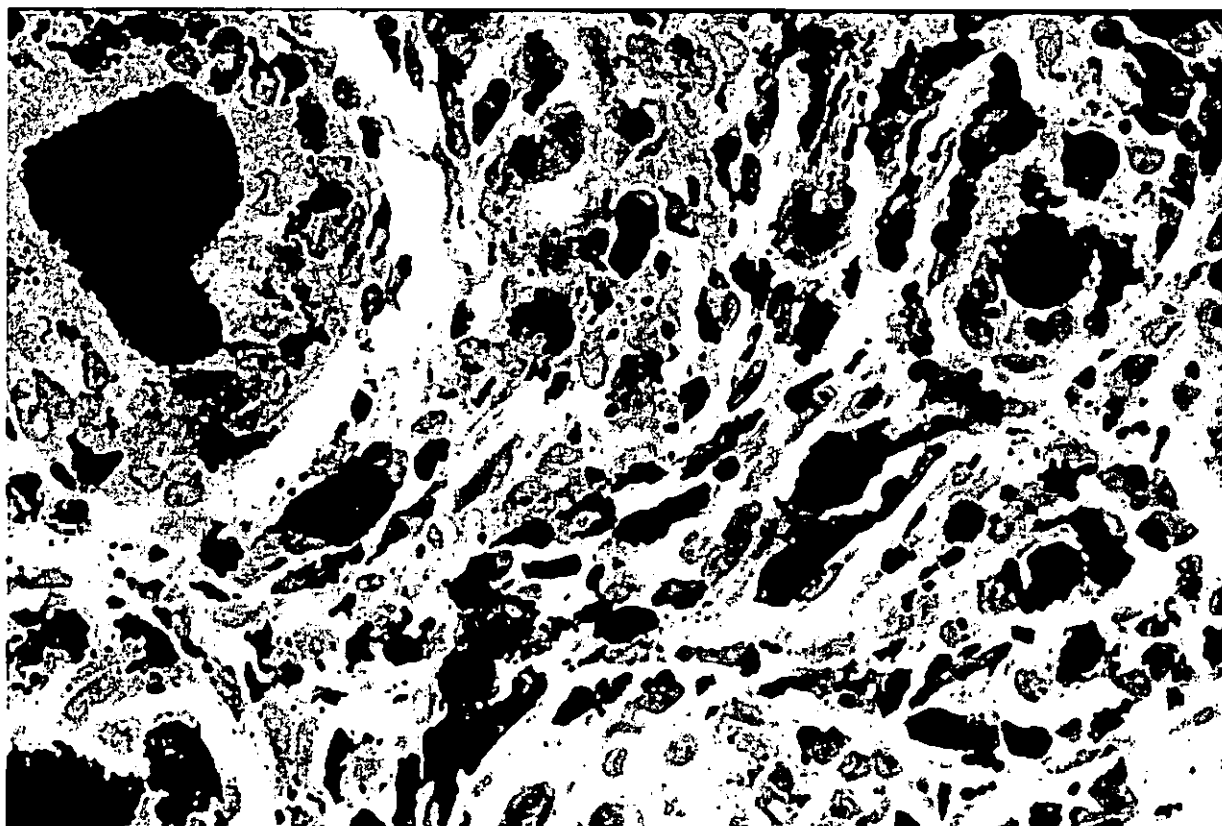


Fig. 6

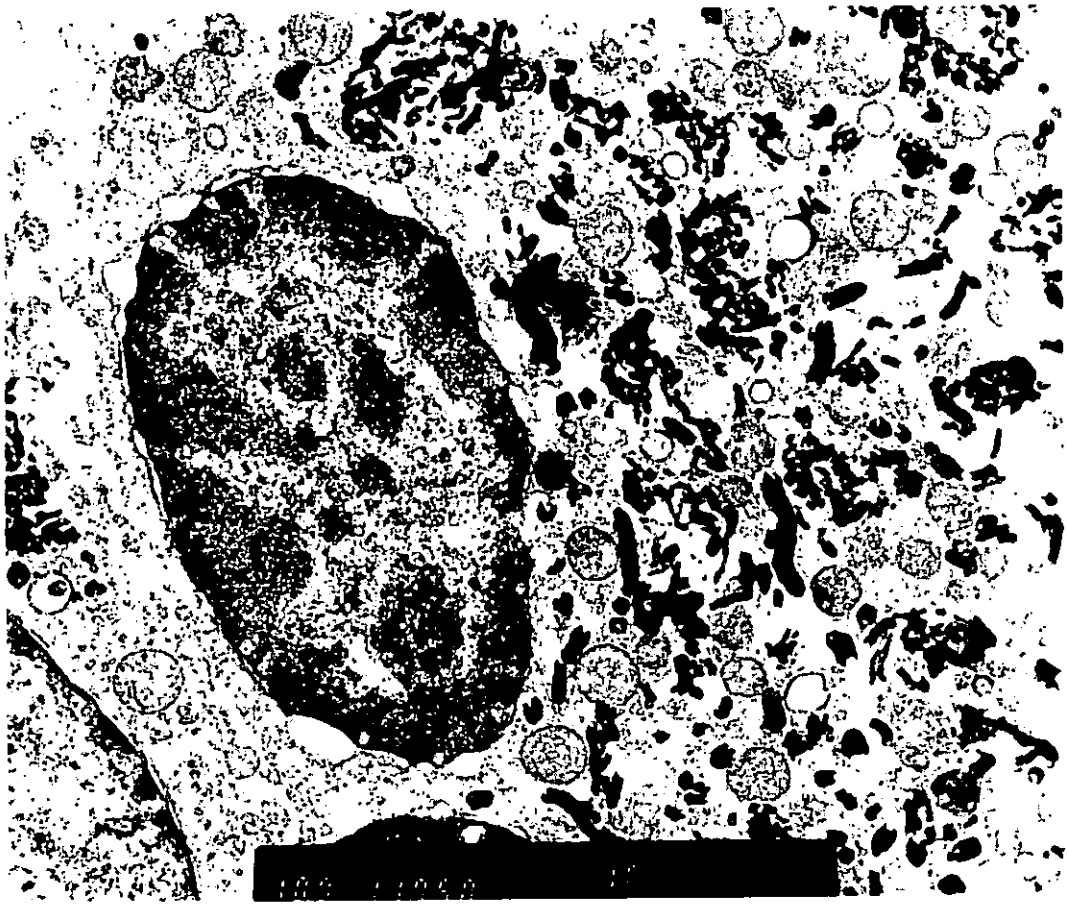


Fig. 7

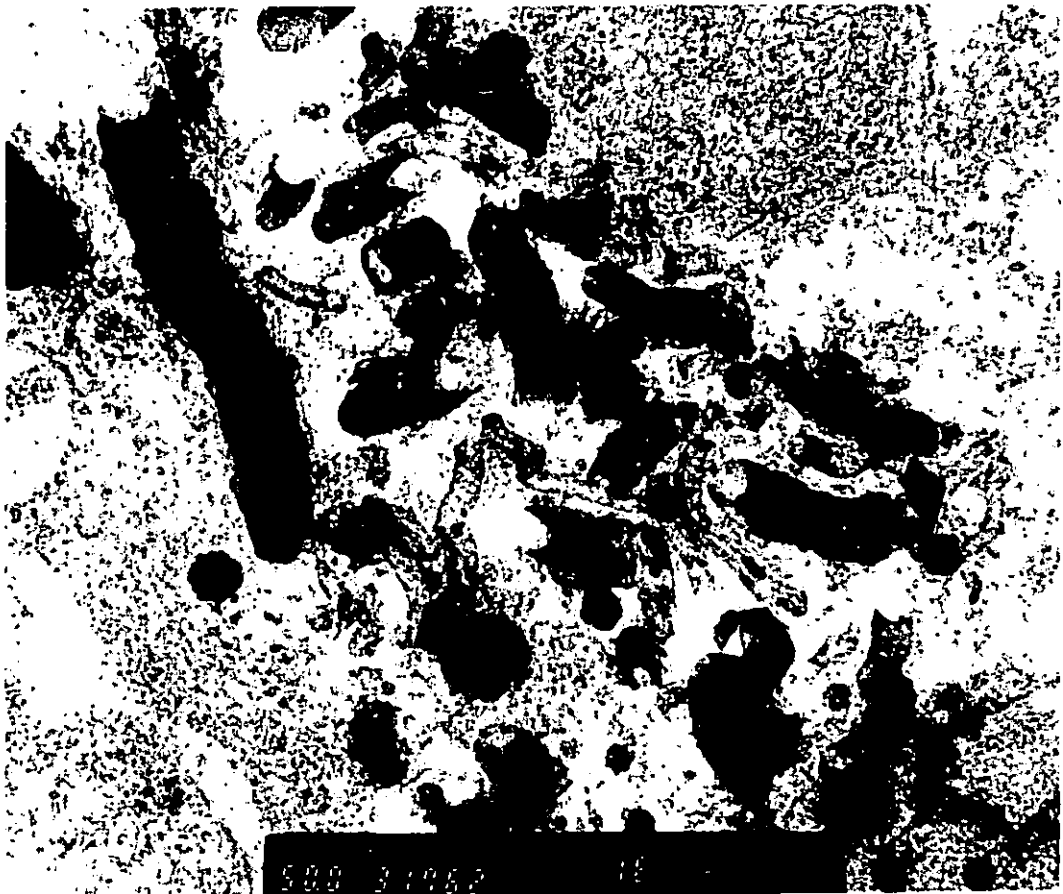


Fig. 7

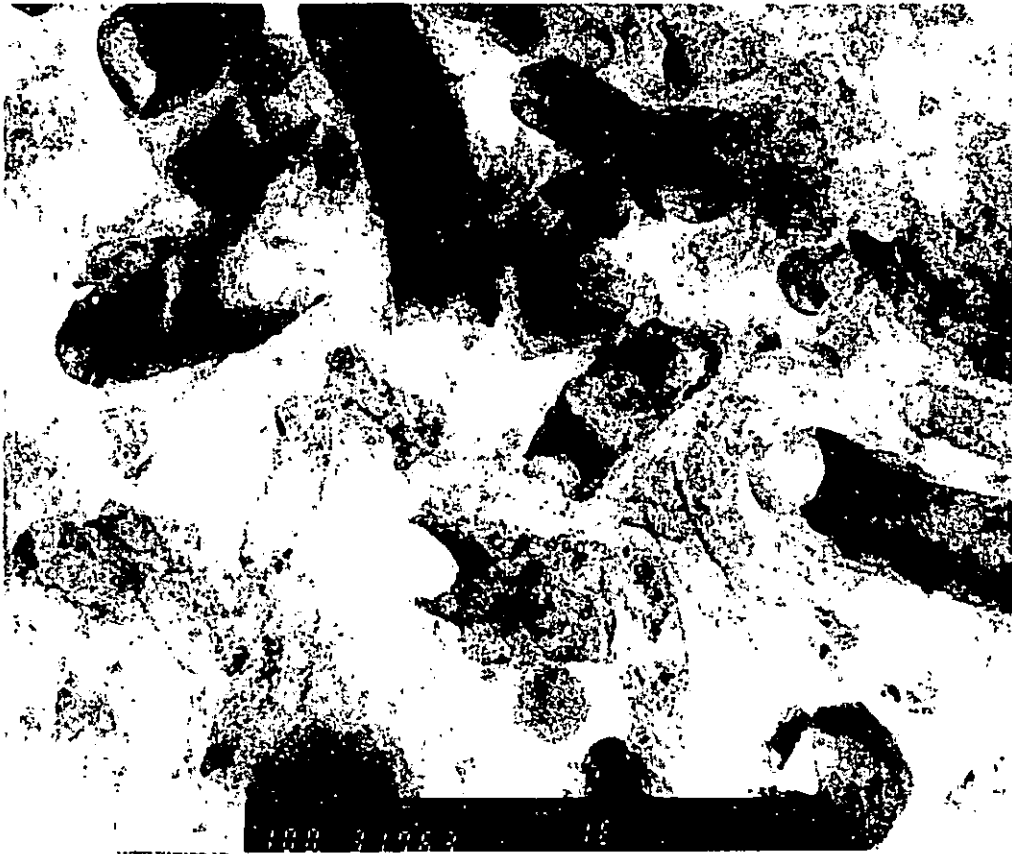


Fig. 9

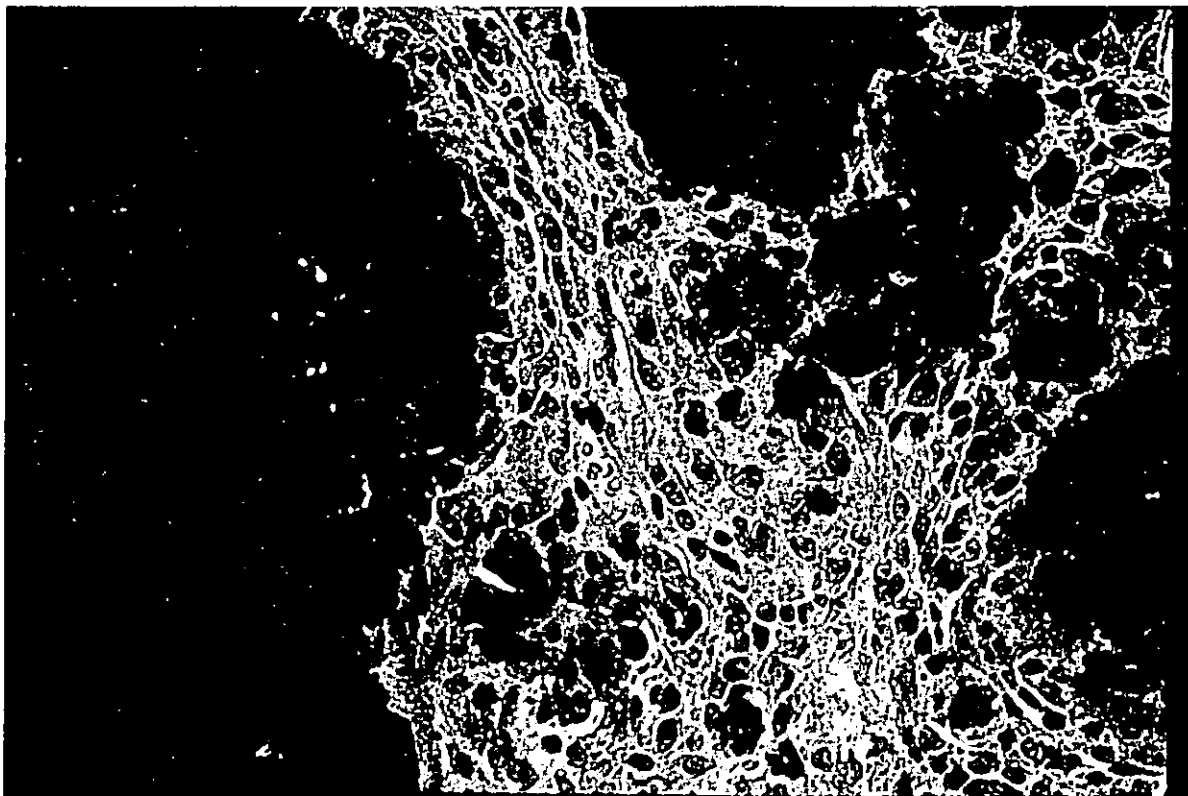


Fig. 10

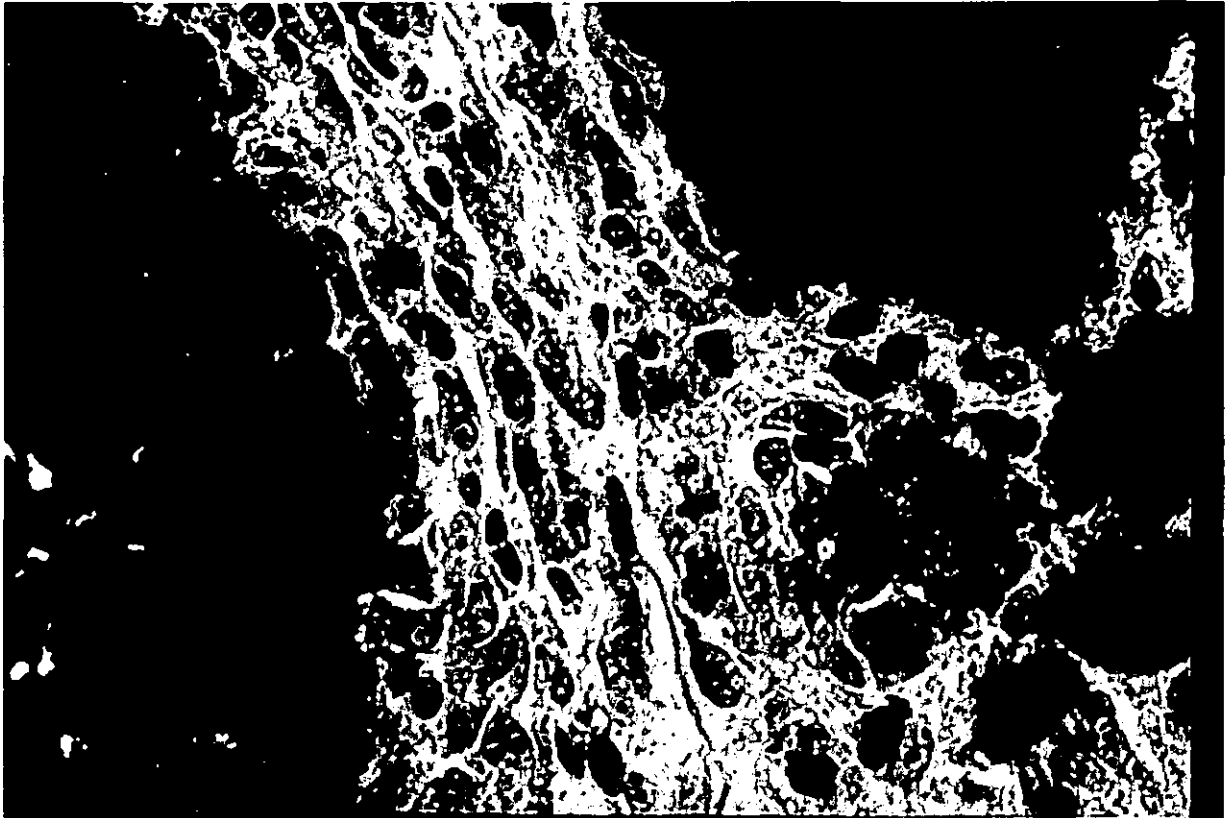


Fig. 11

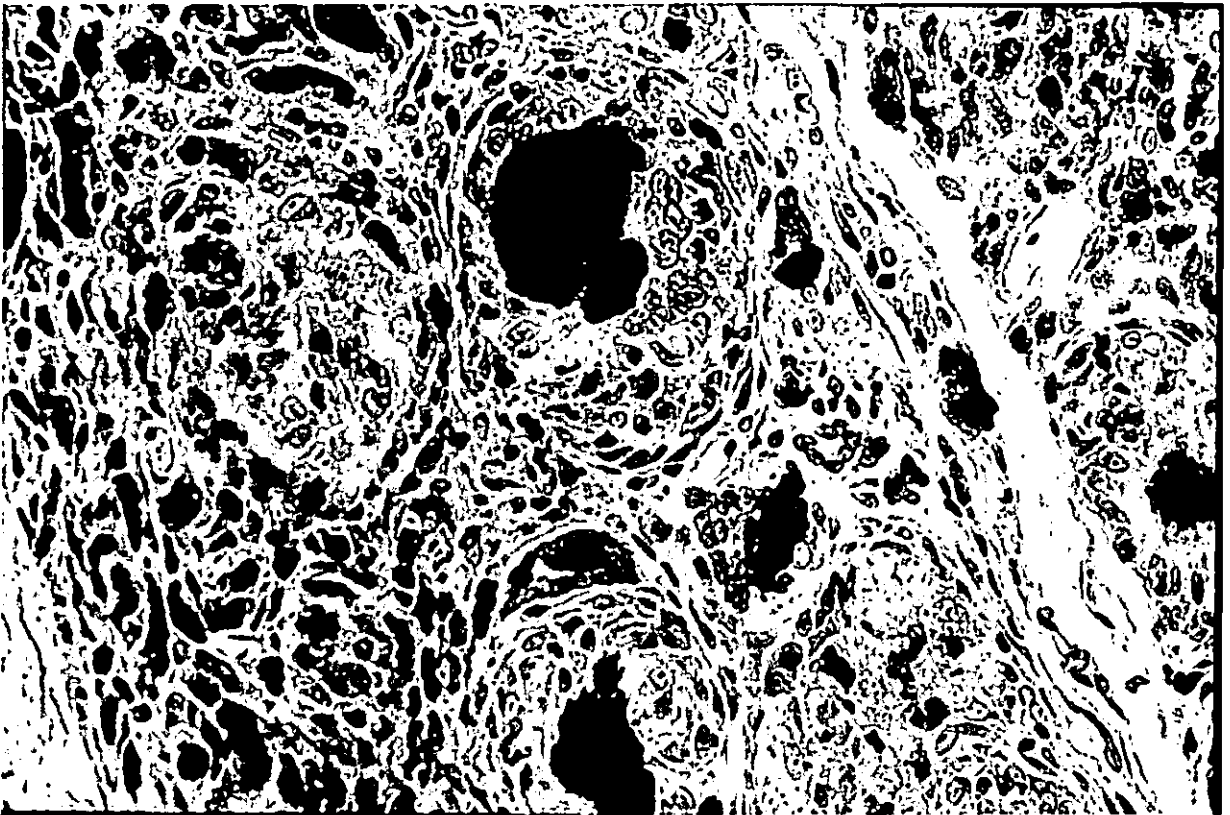


Fig. 12

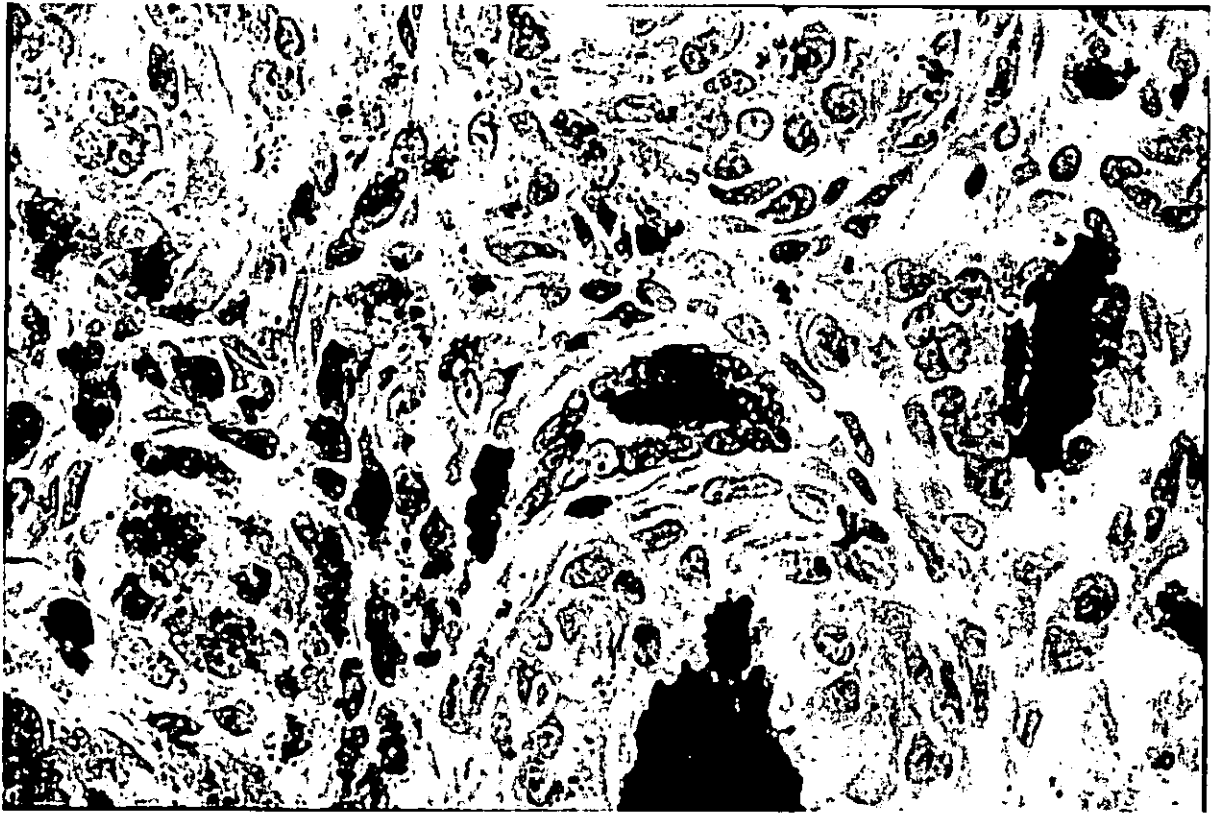


Fig. 13



Fig. 14