

(1) 単細胞個体(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、細胞は生きてままであった。

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。

また同一サイズの針状 TiO₂ 粒子と比較して CNT の炎症性サイトカインの産生レベルは低く刺激性は低かった。

(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れ、増殖細胞と CNT は強固に結合していることが示された。

(7) ミニブタ由来歯根膜細胞株(TesPDL)

不死化したミニブタ由来歯根膜細胞株

(TesPDL)の増殖に及ぼす CNT, CNF の影響を細胞増殖活性(DNA 合成量)、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性で調べると骨芽細胞様細胞と線維芽細胞様細胞では作用に細胞特異性を示した。

(8) 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。

(9) 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。

4.2) 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。

③ 長期埋入試験

6ヶ月の長期埋入試験では肉芽腫の発生は認められず、範囲は限定的で生体に強い影響を及ぼす所見は観察されなかった。

4.3) CNT の生体反応性

以上、一般の微粒子と同様に細胞生存率、増殖率、LDH 産生量、活性酸素産生能、サイトカイン(TNF- α , IL-1 β , 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、3 μm ~ 500nm にかけて最も強くなり、それ以下ではむしろ低下した。形状効果についても同一サイズの針状 TiO₂ 粒子と比較して CNT の刺激性は低く、6ヶ月の長期埋入試験でも肉芽腫の発生は認められず、生体への強い影響は観察されなかった。

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)材料一般に起きるのと同程度か、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。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 は細胞死をほとんど引き起こさない。

4.4) CNT と他のカーボン材料

カーボンにはアモルファス(無定形)、グラファイト(黒鉛)、ダイヤモンド、フラーレン、カーボンナノチューブ(CNT)の結晶構造の異なる多形が存在し、CNT にも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)、カーボンナノファイバー(CNF)、カーボンナノホーン(CNH)ほかの派生体がある。また炭素繊維、活性炭、ガラス状炭素(グラッシーカーボン)、ダイヤモンド状カーボン(DLC)、熱分解炭素(パイロリティックカーボン PC)等、多様な 2 次炭素材料群がある。バイオマテリアルとしては抗血栓性の特徴を活かした人工心臓弁用材料としてグラファイトや熱分解炭素が多用されている。

今回行った様々なバイオ応用開発研究ではグラファイトや活性炭をコントロールして比較に用いた。アパタイト析出性、細胞付着性・伸展性、細菌吸着性等いずれも CNT はすぐれていた。逆にグラファイトはいずれもきわめて悪く、抗血栓性にすぐれる特性によく合致したと言える。同じ炭素でありながらグラファイトと CNT は特性がきわめて異なり、当初の bioinert(生体不活性)という予想に比べ、すぐれたバイオ応用特性を有していると言える。

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。

4.5) 様々な CNT 群

今回、平均長の異なる MWCNT(670, 545, 220 nm)、CNF(2370, 1160, 590nm)および SWCNT, CNC など様々な CNT 群を用い、特性を調べた。これら純度(Ni, Fe 触媒等の不純物除去)、精製度(アモルファスカーボン等、他の同素体除去)、形状(長さ)をコントロールし、素性が明確な試料を様々な研究に共通に使用した。その結果、サイズ依存性ととも、いくつかの特性では結晶構造(CNT の種類)にも依存する結果が得られた。in vitro での炎症性サイトカイン産生、in vivo での炎症の程度、マクロファージの異物処理能、細胞内ライソゾームでのある種の biodegradation の進行等、CNF のほうが CNT よりも刺激性、起炎性が少ないようである。CNF はその結晶構造からハット層間の劈開により長軸方向に寸断されやすく、また表面未反応基が親水性になりやすいため、機械的、化学的、したがって生物学的にも相対的に CNT よりも処理されやすい可能性が考えられる。またスカフォールドとしての細胞付着・伸展性や焼結バルク体の特性に単層および多層カーボンナノチューブ間に差が見られ

た。

4.6) アスベストとの関連

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。6ヶ月の長期埋入試験を行った結果からはNi微粒子では腫瘍が発生したが、CNTでは肉芽腫の発生は認められず、範囲は限定的で生体に強い影響を及ぼす所見は観察されなかった。また同一サイズの針状TiO₂粒子と比較してCNTの炎症性サイトカインの産生レベルは低く刺激性は低かった。今回行った短中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ず、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。

4.7) バイオ応用に使用するCNT試料の調整

市販のCNT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相当である。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。

D5. CNTのバイオ応用開発

CNTについては前年と同様、為害性はあまり観察されず、短中期的には発癌性は認められていない。むしろますますバイオ応用の観点上、有利かつ興味深い特性が明かとなった。CNTの様々な派生体間の差異、結晶構造依存性が認められた。これらはいまだ萌芽的段階といえるものであるが、将来の発展性は十分大きいと言える。

① アパタイトのバイオミメティック・コーテ

ィング

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。

② 細胞増殖用スcaffolds

CNTの表面は疎水性で細胞の生着性にすぐれ、細胞は広く伸展しながら成長し、細胞末端では突起がCNT叢内部に伸展、嵌入して強固に結合し、すぐれた細胞付着・伸展性を示した。

③ 細菌吸着

殺菌等の化学的・薬理的効果によらず、物理的吸着により著しく細菌数を低減する効果を認めた。

④ コンポジットレジン/歯質 接着界面マーカー：コラーゲンとの相互作用による歯質への選択吸着

CNTは疎水性でコラーゲンに吸着しやすく、エッチング処理した歯質のうちで、エナメル質に吸着されず、コラーゲン線維が露出した象牙質にのみ選択的に吸着される。このことを利用し、コンポジットレジン修復時に歯質に塗布し、レジン再削合時の過剰な歯質の削合を回避する肉眼認識用レジン/歯質界面マーカーとして応用した。再削合時の削合の誤差は最大120μm程度で不要な過剰歯質削合はほとんどない。

⑤ 環境浄化用選択吸着剤－CNTゾル内包アルギン酸ビーズ

環境中の芳香族系有害性物質をはじめとする汚染物質の選択吸着・除去、将来的には生体内の有害物質の選択除去に応用可能な、CNT/アルギン酸ナトリウムコロイドを内包したアルジネート酸ビーズを開発した。

⑥ アルギン酸ビーズによる経口投与試験

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。

⑦ リポソームへのCNT組み込み

生体膜へのCNT,CNFの作用を調べるモデルの作成、およびドラッグデリバリーシステムの担体としての物理的、化学的性質の改善を目的に、リポソームへのCNT組み込みを行っ

た。

⑧ 糖鎖、タンパク質による表面修飾

疎水性のCNTは物理吸着により容易に糖鎖、タンパク質による表面修飾が可能である。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。

⑨ 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。

⑩ カーボンナノカプセル

Ce含有カーボンナノカプセルの有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。

⑪ CNT焼結固化体

放電プラズマ焼結で作製した焼結体は機械的特性が骨と類似し、また破壊時、繊維状のCNTの引抜きの摩擦抵抗のため、破壊が徐々に進行し、見かけ上、擬似塑性変形を示し、破壊靱性が向上した。

⑫ ナノアパタイト/CNTコンポジット

放電プラズマ法により50nm以下のアパタイト粒とMWCNTからなるナノアパタイト/カーボンナノチューブコンポジット(nHA/CNT)を作製した。コラーゲンとナノアパタイト微結晶からなる骨に類似し、骨再生への応用が期待される。

⑬ CNT複合材料

CNT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。

D 6. ナノコンポジット

(1) ナノアパタイトの機能性

人工アパタイトは典型的なbioactive材料で骨誘導性に富むが、通常生体中で非吸収性であり骨に置き換わることは無い。したがって骨代替用構造材としてインプラントに使用される。骨のアパタイトは約50~100nmの結晶性の劣る、約6%ほど炭酸化した hidroキシアパタイトのナノ結晶からなり、コラーゲン線維との複合材料として気孔の大きい構造を形づくりながら、骨を構成する。人工アパタイトも50nm程度のナノ結晶になると生分解性に變化し、生体に吸収されつつ骨再生を促し新生骨に置き換わる骨置換性に機能が変化する。

このナノアパタイトコンポジットとして本プロジェクトでは(1)室温における湿式と(2)高温における乾式合成の全く異なる2つの方法で作製した。

(2) ナノ炭酸化アパタイト/コラーゲンコンポジットの開発

① 新しい骨置換性材料として、骨に組成、結晶サイズ、気孔形状の類似したナノ炭酸ハイドロキシアパタイト/コラーゲン(nCHAC)複合体を室温にてバイオミメティック法で作製した。このナノアパタイトは2.8-14.7 wt%の炭酸基を含有するため、低結晶性で溶解性が高く、より早く骨置換が進行すると期待される。

② この複合体の機械的特性をさらに改善するために、生分解性ポリ乳酸-グリコール酸共重合体で強化した骨置換性ナノコンポジット(nCHAC/PLGA)も作製した。

③ このナノコンポジットを骨や歯周組織の再生治療時に用いられるGTR法に応用するために、ナノ炭酸ハイドロキシアパタイト+コラーゲン/ポリ乳酸-グリコール酸共重合体コンポジット(nCHAC/PLGA)をシート状にし、さらに内面と外面に異なる機能性を持たせるために、厚さ方向にアパタイト含有率を傾斜させた傾斜機能型GTR膜を開発した。in vitroでのdegradation(崩壊性)試験では内面と外面の崩壊速度が異なり、アパタイト含有側では約8週後から分解速度が加速されCaイオンの放出が増大した。

(3) ナノアパタイト/CNTコンポジットの開発

④ $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [=DCPD]と $4\text{Ca}(\text{OH})_2$ の混合粉末からアパタイトを生成させる乾式合成を、放電プラズマ法(SPS)による1200℃でのMWCNTとの焼結時に同時に進行させ、50nm以下のアパタイト粒とMWCNTからなるナノアパタイト/カーボンナノチューブコンポジット(nHA/CNT)を作製できた。コラーゲンとナノアパタイト微結晶からなる骨に類似している点で、きわめて興味深い構造をしている。

E. 結論

材料の生体適合性は通常イオン溶出性などの化学的性質の影響が支配的であり材質に依存性する。ナノ/マイクロ微粒子になると比表面積や反応活性点が増加するから、ある種の触媒の

ように反応性は著しく増大し、ナノテクノロジーのメリットを享受できるが、またある場合には為害作用が昂進するデメリットとして発現する場合も起こり得る。もともと化学的に為害性がある Be, Cd, V, Ni 等では当然毒性は強くなり、発癌性などのナノトキシコロジーを引き起こすことになる。

生体親和性(bioactive, bioinert)材料においてはおよそ 100 μm 以上の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、100 μm 以下粒子径が小さくなるほど刺激性は増大し、50 μm 以下では炎症性反応を惹起し、10 μm 以下になると貪食作用を誘発し、3 μm ~ 500nm の領域で炎症性サイトカイン・活性酸素の放出等の細胞障害性、血管拡張・細胞浸潤等の周囲組織の炎症は最も顕著になる。500nm ~ 50nm ではその程度はやや低下する傾向を示し、ナノサイズの CNT, TiO₂ では細胞障害性は低くなる。微粒子の形状依存性については針状粒子は塊状粒子よりも為害性が高かった。

このような効果は bioactive, bioinert な金属、セラミックス、ポリマー材料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、 μm ~ 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し、細胞・組織刺激性を生起する。

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し、創傷治癒の遅延を引き起こす点で注意が必要である。人工関節の骨頭摺動部に発生する摩耗粉などで典型的な問題になると考えられる。

この微粒子の物理的サイズ依存性に基づく細胞・組織刺激性、障害性は 3 μm -500nm の微粒子に対して最も強く、それ以下ではむしろ低下したが、このことは一局面では刺激性が低下するという点で好都合という反面、全身レベルで

の生体防御機構の観点からは単純に無害になるとは結論づけられないであろう。ナノパーティクルは人体が生体防御機構の対象として想定してこなかった新たな異物である。50nm 以下になるとマクロファージ等の細胞がナノ粒子を異物と認識できない、あるいは処理できない可能性があり、そのままリンパ液や血液に取り込まれ、生体の防御機構に捕捉されずに全身に拡散し、暴露部位以外の他臓器に影響を及ぼす可能性もある。

逆に薬物導入の観点からはこうしたサイズ領域では粒子に異物と認識されないステルス機能を持たせられる可能性があり、DDS における患部への移送過程上の一つの障害を取り除くバイオ応用上のメリットとして活用できる可能性がある。

「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？」というナノトキシコロジー問題に対応するためには、in vitro, in vivo 局所領域での生体反応素過程とともに、全身環境中での微粒子動態も代表的な材料に対してシステムチックに検索し、ナノトキシコロジー/安全性条件を見極めた上で提起したナノテクノロジー開発指針に沿ってバイオ応用展開を図ることが必要と考えられる。

一部からアスベストと同様な毒性の可能性が指摘されている 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、短中期的には発癌性など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。むしろバイオ応用の観点から生体材料として有利な細胞・組織に対する種々の特徴的な親和性が多数見出された。また CNT の様々な派生体間の差異、結晶構造依存性が認められた。

バイオ用 CNT として、バイオ応用に適したサイズに調整した可溶性 CNT および処理性の高い CNF、親水性と分散性に富むナノチューブ/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。

CNT 単体のバイオ応用として、アパタイトのバイオミメティック・コーティング、細胞増殖用スカフォールド、細菌吸着剤、コラーゲン

との相互作用による歯質の選択吸着を利用したコンポジットレジン/歯質 接着界面マーカー、CNT ゾル内包アルギン酸ビーズによる環境浄化用選択吸着剤および経口投与試験、リポソームへの CNT 組み込み、糖鎖・タンパク質による表面修飾、遺伝子導入用担体への応用、カーボンナノカプセルの血管内投与、CNT 複合材料の作製を行った。

また放電プラズマ焼結法により CNT を焼結し、骨に類似した機械的特性と擬似塑性変形、高い破壊靱性を示す CNT 焼結バルク体を作製した。

ナノアパタイトコンポジットとして、湿式によるナノ炭酸化アパタイト/コラーゲンコンポジット、および厚さ方向にナノ炭酸化アパタイト+コラーゲン/ポリ乳酸-グリコール酸共重合体コンポジットの組成を変化させた傾斜機能型 GTR 膜、また乾式高温合成によるナノアパタイト/CNT コンポジットの開発を行った。

これら CNT のバイオ応用開発はいまだ萌芽的段階であるが、将来の発展性は十分大きいと言える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Atsuro Yokoyama, Yoshinori Sato, Yoshinobu Nodasaka, Satoru Yamamoto, Takao Kawasaki, Masanobu Shindo, Takao Kohgo, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Kazuyuki Tohji: Biological Behavior of Hat-Stacked Carbon Nanofibers in the Subcutaneous Tissue in Rats, *Nano Letters* 5(1), 157-161, 2005
- 2) 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、(社)日本機械学会中国四国支部 第93回講演会生体材料最前線教材、9-16, 2004
- 3) Fumio Watari, Yutaka Tamura, Atsuro Yokoyama, Motohiro Uo, Takao Kawasaki: Mechanical Properties and Biocompatibility of Surface-Nitrided Titanium for Abrasion Resistant Implant, *Bioceramics* 16, (Key Engineering Materials Vols. 254-256), 873-876, 2004
- 4) K. Tamura, N. Takashi, T. Akasaka, I. D. Rosca, M. Uo, Y. Totsuka, F. Watari: Effects of Micro/Nano Particle Size on Cell Function and Morphology, *Bioceramics* 16, (Key Engineering Materials

Vols.254-256), 919-922, 2004

5) Fumio WATARI, Atsuro YOKOYAMA, Mamoru OMORI, Toshio HIRAI, Hideomi KONDO, Motohiro UO, Takao KAWASAKI: Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for bio-medical application, *Composites Science and Technology* 64(6), 893-908, 2004

6) B. Fugetsu, S. Satoh, T. Shiba, T. Mizutani, Y. Nodasaka, K. Yamazaki, K. Shimizu, M. Shindoh, K. Shibata, N. Nishi, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari: Large-Scale Production of Ba²⁺-Alginate-Coated Vesicles of Carbon Nanofibers for DNA-Interactive Pollutant Elimination, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 77, 1945-1950, 2004

7) B. Fugetsu, S. Satoh, A. Iles, K. Tanaka, N. Nishi, F. Watari: Encapsulation of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in Ba²⁺-alginate to form coated micro-beads and their application to the pre-concentration/ elimination of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl from contaminated water, *The Analyst (London)*, 129, 565-566, 2004

8) Bunshi Fugetsu, Shuya Satoh, Toshikazu Shiba, Takeo Mizutani, Yong-Bo Lin, Norifumi Terui, Yoshinobu Nodasaka, Katsushi Sasa, Kiyoko Shimizu, Tsukasa Akasaka, Masanobu Shindoh, Ken-Ichiro Shibata, Atsuro Yokoyama, Masanobu Mori, Kazuhiko Tanaka, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, Shunitz Tanaka, Norio Nishi, Fumio Watari: Caged Multiwalled Carbon Nanotubes as the Adsorbents for Affinity-Based Elimination of Ionic Dyes, *Environmental Science & Technology* 38(24), 6890-6896, 2004

9) 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、2003年度傾斜機能材料論文集〈FGM2003〉, 116-121, 2004

10) 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、亘理文夫：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、2003年度傾斜機能材料論文集〈FGM2003〉, 22-27, 2004

11) Iosif Daniel Rosca, Fumio Watari, Motohiro Uo: Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation, *J. of Controlled Release* 99, 271-280, 2004

12) Hideomi Kondo, Atsuro Yokoyama, Mamoru Omori, Akira Ohkubo, Toshio Hirai, Fumio Watari, Motohiro Uo, Takao Kawasaki: Fabrication of Titanium Nitride/Apatite Functionally Graded Implants by Spark Plasma Sintering, *Materials Transactions* 45(11), 3156-3162, 2004

13) 近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇尾基弘、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、2003年度傾斜機能材料論文集〈FGM2003〉, 40-45, 2004

14) Iosif Daniel ROSCA, Fumio WATARI, Motohiro UO, Tsukasa AKASAKA, Kazuchika TAMURA: Mechanism of biodegradable polymer microparticle formation by emulsification solvent evaporation method, *Proceedings of the 15th FGM 2003 Sapporo*, 87-92, 2004

15) 横山敦郎、松野浩宜、川崎貴生、水越孝典、石川誠、戸塚靖則、野田坂佳伸、宇尾基弘、亘理文夫、

- 向後隆男：各種顕微鏡および発光分光分析装置を用いた摘出インプラント周囲組織中のチタンの分析、北海道歯学雑誌 25(2), 330-338, 2004
- 16)Shoji Ohkawa, Kuniyoshi Ishii, Motohiro Uo, Toshi Sugawara, Fumio Watari: Slip Casting of Titanium Powder for Dental Prosthetic Appliances, Materials Transactions 45(4), 1132-1139, 2004
- 17)Motohiro Uo, Fumio Watari: Rapid analysis of metallic dental restorations using X-rayscanning analytical microscopy, Dental Materials 20, 611-615, 2004
- 18)Motohiro Uo, Masaya Tanaka, Fumio Watari: Quantitative Analysis of Biologic Specimens by X-Ray Scanning Analytic Microscopy, J.Biomed.Mater.Res.Part B: Appl.Biomater. 70B, 146-151, 2004
- 19)宇尾基弘、亘理文夫、熊澤隆一郎、田村一央、戸塚靖則、横山敦郎、川崎貴生：歯科技工士にも理解できる X 線分析顕微鏡の歯科医療への応用、日本歯技 420, 33-39, 2004
- 20)宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫：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、2003 年度傾斜機能材料論文集〈FGM2003〉, 127-132, 2004
- 21)Keiji Iwasaki, Shoji Ohkawa, Iosif D.Rosca, Motohiro Uo, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari: Distortion of Laser Welded Titanium Plates, Dental Materials Journal 23(4), 593-599, 2004
- 22)Keiji Iwasaki, Shoji Ohkawa, Motohiro Uo, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari: Laser Welding of Titanium and Dental Precious Alloys, Materials Transactions 45(4), 1140-1146, 2004
- 23)岩崎佳治、大川昭治、赤坂 司、宇尾基弘、亘理文夫：純チタンと歯科用貴金属合金のレーザー溶接、2003 年度傾斜機能材料論文集〈FGM2003〉, 52-57, 2004
- 24)田中 聡、亘理文夫、飯田順一郎：繊維強化プラスチック型審美矯正ワイヤーの湿潤環境下での機械的特性挙動、歯科材料・器械 23(1), 29-39, 2004
- 25)Kazutoshi Tani, Fumio Watari, Motohiro Uo, Manabu Morita: Fluorescent Properties of Porcelain-Restored Teeth and Their Discrimination, Materials Transactions 45(4), 1010-1014, 2004
- 26)Magda Kiyoko Yamada, Motohiro UO, Shoji Ohkawa, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari: Non-Contact Surface Morphology Analysis of CO2 Laser-Irradiated Teeth by Scanning Electron Microscopy and Confocal Laser Scanning Microscopy, Materials Transactions 45(4), 1033-1040, 2004
- 27)Magda K. Yamada, Motohiro Uo, Shoji Ohkawa, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari: Three-Dimensional Topographic Scanning Electron Microscope and Raman Spectroscopic Analyses of the Irradiation Effect on Teeth by Nd:YAG,Er:YAG, and CO2 Lasers, J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. 71B, 7-15, 2004
- 28)亘理文夫：チタンとカルシウムの特徴を兼ね備えた人工歯根、ふえらむ 9(3), 6, 2004
- 129, 2004
- 平成 16 年度春期・第 43 回日本歯科理工学会学術講演会、H16/4/10-11, 千葉(東京歯科学)
- 2)近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇尾基弘、大川昭治、赤坂 司、菅原 敏、亘理文夫：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と評価、歯科材料・器械 23(2), 60, 2004
- 平成 16 年度春期・第 43 回日本歯科理工学会学術講演会、H16/4/10-11, 千葉(東京歯科学)
- 3)王 蔚、近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇尾基弘、大川昭治、赤坂 司、菅原 敏、大森 守、亘理文夫：カーボンナノチューブ焼結体の作製とその特性、歯科材料・器械 23(2), 133, 2004
- 平成 16 年度春期・第 43 回日本歯科理工学会学術講演会、H16/4/10-11, 千葉(東京歯科学)
- 4)K. Tamura, N. Takashi, M. Uo, T. Akasaka, R. Iosif, Y. Totsuka, K. Tohji, F. Watari: Biologic Effects Induced By Micro/Nano Particles In Vivo And In Vitro Study, 7th World Biomaterials Congress Final Program, 68, 2004
- 7th World Biomaterials Congress, Sydney, May 17-21, 2004
- 5)F. Watari, H. Kondo, Y. Tamura, A. Yokoyama, M. Omori, T. Hirai, M. Uo, T. Kawasaki: Fabrication and Properties of Titanium Nitride and Titanium Nitride/Apatite Functionally Graded Material for Abrasion Resistant Implant, 7th World Biomaterials Congress Final Program, 118, 2004
- 7th World Biomaterials Congress, Sydney, May 17-21, 2004
- 6)Iosif D. Rosca, Fumio Watari, Motohiro Uo, Tsukasa Akasaka, Kazuchika Tamura: In situ optical microscopic observation of microparticle formation in emulsification solvent evaporation method, 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (8APEM) Program and Summaries, 113, 2004
- 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (8APEM), Kanazawa, June 7-11, 2004
- 7)Kazuchika Tamura, Motohiro Uo, Noriyuki Takashi, Yoshinori Sato, Kazuyuki Toji, Yasunori Totsuka, Fumio Watari: Influence of Carbon nano capsule on cell function and proliferation of Human Fibroblast, Abstracts of The 27th Fullerene-Nanotubes General Symposium, 31, 2004
- The 27th Fullerene-Nanotubes General Symposium, Tokyo, July 28-30, 2004
- 8)Naofumi Aoki, Atsuro Yokoyama, Takao Kawasaki, Yoshinobu Nodasaka, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji: Development of Scaffold made of Carbon Nanotubes for Cell Culture, Abstracts of The 27th Fullerene-Nanotubes General Symposium, 200, 2004
- The 27th Fullerene-Nanotubes General Symposium, Tokyo, July 28-30, 2004
- 9)Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji: Biomimetic coating of carbon nanotube surface, Abstracts of The 27th Fullerene-Nanotubes General Symposium, 201, 2004
- The 27th Fullerene-Nanotubes General Symposium, Tokyo, July 28-30, 2004
- 10)Yoshinori Sato, Balachandran Jeyadevan, Kazuyuki Tohji, Rikizo Hatakeyama, Kazuchika Tamura, Tsukasa

2. 学会発表

- 1)田村一央、高師則行、イオシフ ロスカ、赤坂司、瀧美 崇、佐藤義倫、亘理文夫、戸塚靖則：ナノ・マイクロ微粒子の生体への影響、歯科材料・器械 23(2),

- Akasaka, Motohiro Uo, Atsuro Yokoyama, Ken-ichiro Shibata, Fumio Watari: Water-soluble hat-stacked-type carbon nanofibers for biomedical applications, Abstracts of The 27th Fullerene-Nanotubes General Symposium, 202, 2004
The 27th Fullerene-Nanotubes General Symposium, Tokyo, July 28-30, 2004
- 11)赤坂 司、宇尾基弘、亘理文夫：バイオミメティックコーティングを用いたカーボンナノチューブの表面修飾、平成16年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏期セミナープログラム、2004
平成16年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏期セミナー、H16/7/31、郡山(市民プラザ)
- 12)宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫：XAFSを用いた金属インプラント周囲組織の分析、平成16年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏期セミナープログラム、2004
平成16年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏期セミナー、H16/7/31、郡山(市民プラザ)
- 13)Fumio Watari, Kazuchika Tamura, Noriyuki Takashi, Takao Kohgo, Motohiro Uo, Yoshinobu Nodasaka, Takafumi Domon, Yasunori Totsuka: Size Dependence of Cytotoxicity in Fine Particles of Titanium, Nickel and Others, Archives of BioCeramics Research Vol.4, 78, 2004
Archives of BioCeramics Research, Kongju (Korea), September 6-8, 2004
- 14)宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫、横山敦郎、田村一央、戸塚靖則：XAFSを用いた金属インプラント周囲組織の分析、歯科材料・器械 23(5), 327, 2004
平成16年秋期・第44回日本歯科理工学会学術講演会、H16/9/24、京都(テルサホール)
- 15)王 蔚、近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇尾基弘、大川昭治、赤坂 司、菅原 敏、亘理文夫、大森守：カーボンナノチューブ固化体の焼結と生体適合性、歯科材料・器械 23(5), 330, 2004
平成16年秋期・第44回日本歯科理工学会学術講演会、H16/9/24、京都(テルサホール)
- 16)廖 素三、田村一央、亘理文夫：好中球と骨芽細胞を用いたナノアパタイト/コラーゲン複合体の生体親和性評価、歯科材料・器械 23(5), 339, 2004
平成16年秋期・第44回日本歯科理工学会学術講演会、H16/9/24、京都(テルサホール)
- 17)赤坂 司、宇尾基弘、大川昭治、菅原 敏、亘理文夫：バイオミメティックコーティングを用いたカーボンナノチューブの表面修飾、歯科材料・器械 23(5), 392, 2004
平成16年秋期・第44回日本歯科理工学会学術講演会、H16/9/24、京都(テルサホール)
- 18)WATARI Fumio, AKASAKA Tsukasa, SATO Yoshinori, TOHJI Kazuyuki: Apatite formation on carbonnanotubes, Program & Abstracts of the Second Asia Symposium on Biomineralization, 61, 2004
The Second Asia Symposium on Biomineralization, Tsinghua University(China), October 4-6, 2004
- 19)Y. Sato, M. Ohtsubo, B. Jeyadevan, K. Tohji, K. Motomiya, R. Hatakeyama, G. Yamamoto, M. Omori, T. Hashida, K. Tamura, T. Akasaka, M. Uo, A. Yokoyama, F. Watari: Biocompatibility of carbon nanotube disk, Proceedings of SPIE Reprint, 623, 2004
The International Society for Optical Engineering, Philadelphia(USA), October 25-28
- 20)中田景子：カーボンナノチューブを用いたレジン/歯質界面の修飾、日本歯科医師会雑誌 57(4), 153, 2004
第20回日本歯科医学学会総会、H16/10/29-31、横浜(パシフィコ横浜)
- 21)亘理文夫、田村一央、横山敦郎、青木尚史、宇尾基弘、古月文志、大森 守、佐藤義倫、田路和幸：生体反応性に及ぼす微粒子の影響、粉体粉末冶金協会講演概要集、92, 2004
粉体粉末冶金協会平成16年度秋季大会、H16/11/9-11、広島(広島県情報プラザ)
- 22)田村一央、高師則行、宇尾基弘、佐藤義倫、渥美 崇、ロスカ・イオシフ、田路和幸、戸塚靖則、亘理文夫：ナノ微粒子に対する in vivo/in vitro でのラットマクロファージの反応、第11回つくばバイオマテリアル研究会予稿集、55, 2004
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004第11回つくばバイオマテリアル研究会、H16/11/15-16、つくば(つくば国際会議場エポカル)
- 23)赤坂 司、亘理文夫：複合糖質高分子によるカーボンナノチューブの表面修飾、第11回つくばバイオマテリアル研究会予稿集、134, 2004
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004第11回つくばバイオマテリアル研究会、H16/11/15-16、つくば(つくば国際会議場エポカル)
- 24)Susan Liao, Fumio Watari, Kazuchika Tamura, Shoji Ohkawa, Motohiro Uo: The nano-hydroxyapatite/collagen based biomimetic materials for orthopaedics and dentistry, 第11回つくばバイオマテリアル研究会予稿集、223, 2004
日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004第11回つくばバイオマテリアル研究会、H16/11/15-16、つくば(つくば国際会議場エポカル)
- 25)Fumio Watari: Particles and Reaction of Cells and Tissue, Abstract of International Symposium of Tissue Response and Biomedical Application of Carbon Nanotubes, Nanofibers, and Nanoparticles, 1, 2004
International Symposium of Tissue Response and Biomedical Application of Carbon Nanotubes, Nanofibers, and Nanoparticles, Matsushima(Miyagi), Dec.20, 2004
- 26)青木尚史、横山敦郎、野田坂圭伸、赤坂 司、宇尾基弘、亘理文夫、佐藤義倫、田路和幸：細胞培養用担体としてのカーボンナノチューブの応用、第28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、21, 2005
第28回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、H17/1/7-9、名古屋(名城大学)

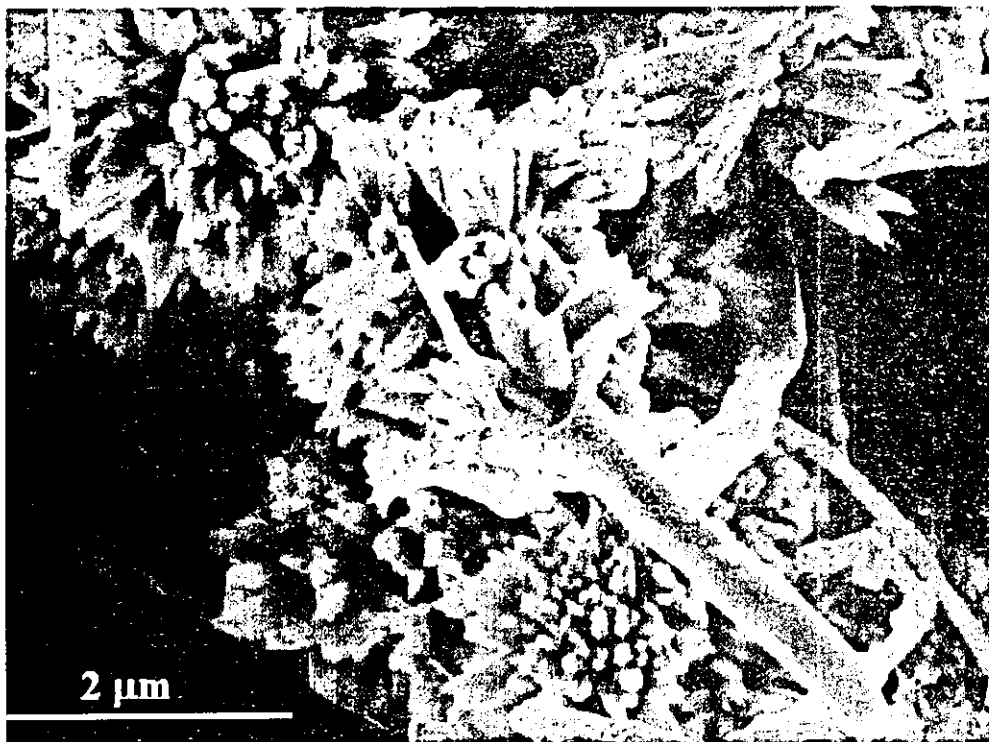


図1 人工体液中で CNT 表面に析出したアパタイト微結晶の SEM 像

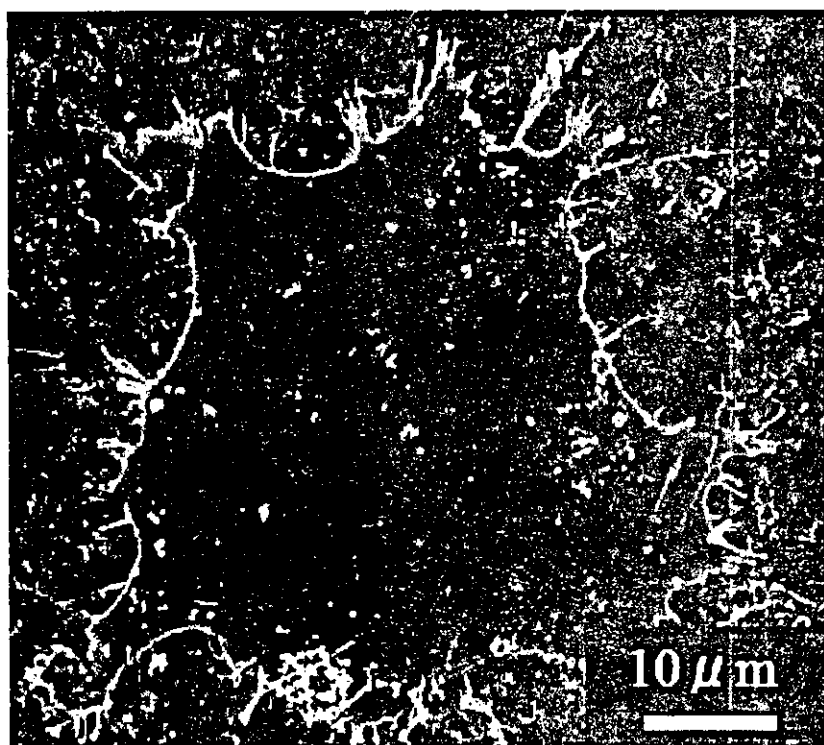


図2 CNT スカフォールド上で成長、展伸した細胞の SEM 像

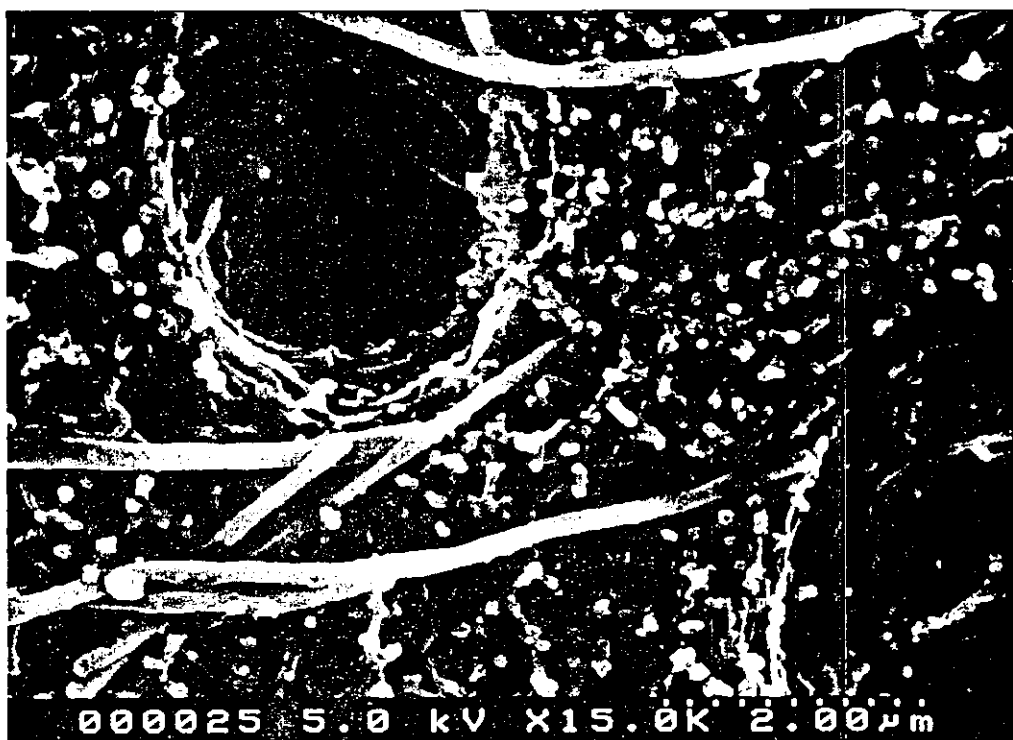
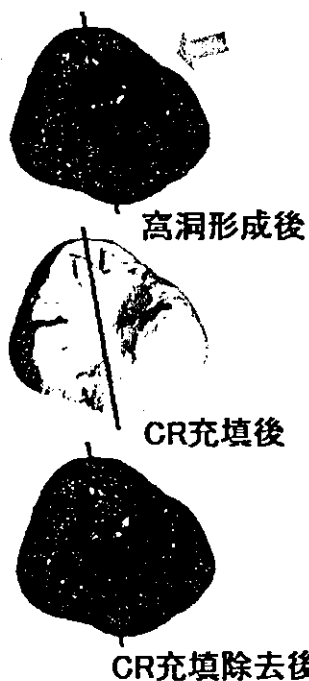
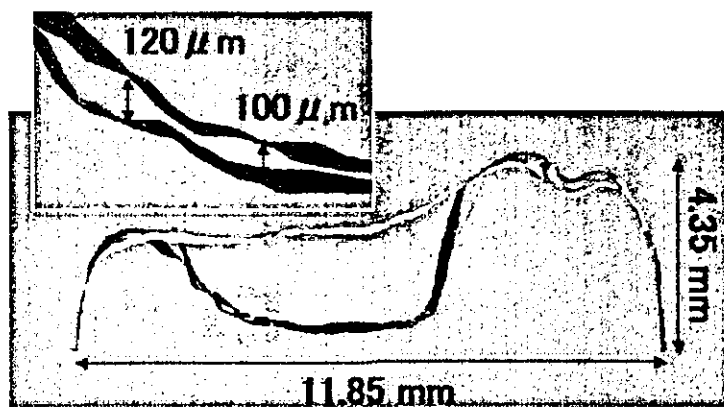


図3 象牙質とCNT。多数のコラーゲンと象牙細管が見える。



CNTマーカを使用すると、CR除去時、下図のように高洞形成時と比べ、最大でも120 μ m程度の誤差で、再削合できる。



窩洞形成咬合面の3Dスキャナ像

左図実線部の断面プロファイル

図4 CNT マーカーを塗布した場合のコンポジットレジン修復後、再削合時の断面プロファイル。CNT のマーカー効果により、不要な歯質削合はほとんどない。

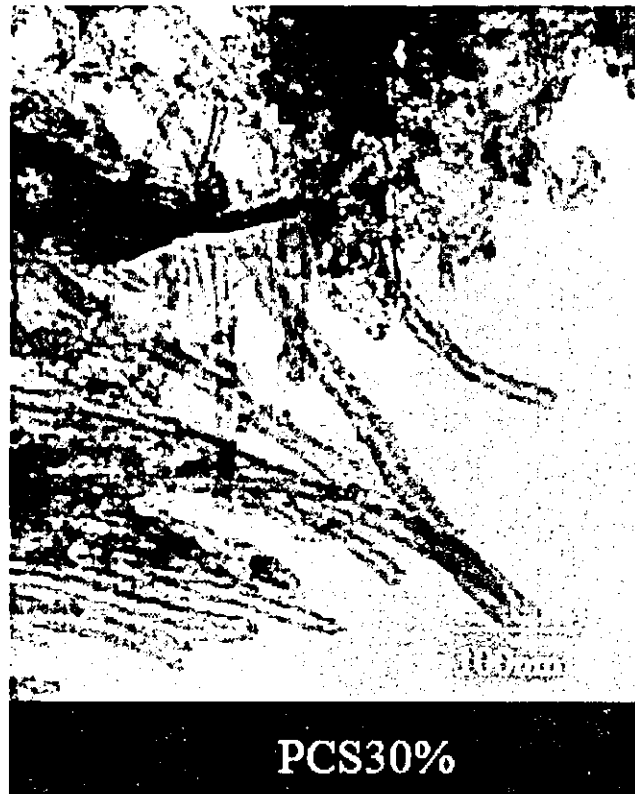


図5 CNT 焼結体の破断面(TEM 像)。CNT のチューブ構造が維持され、引抜き変形を受けている。

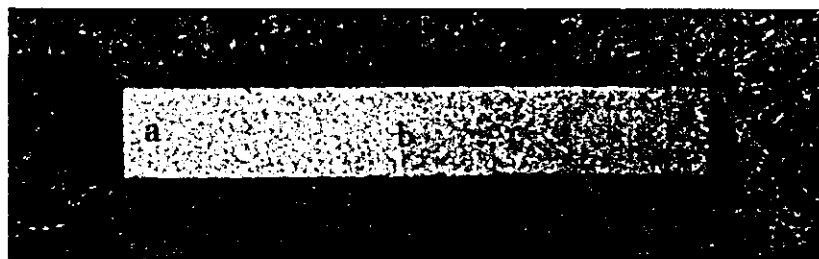


図6 TiN-20/80HAP 傾斜機能型インプラント。全体および各部位の強拡大像(SEM)。

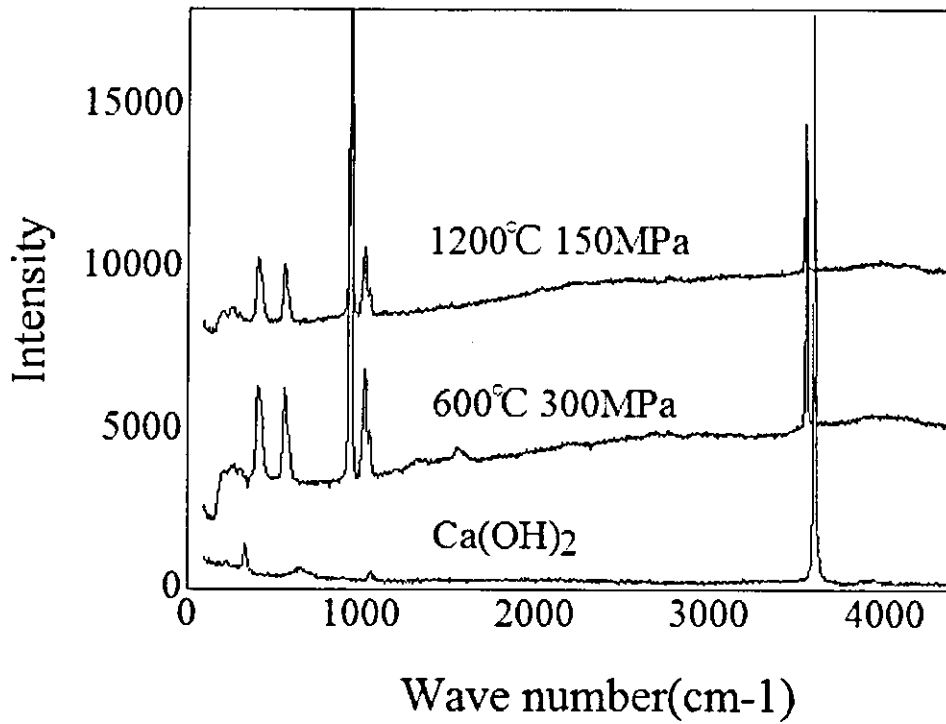


図7 TiN-20/80HAP 傾斜機能型インプラントのラマンスペクトル。

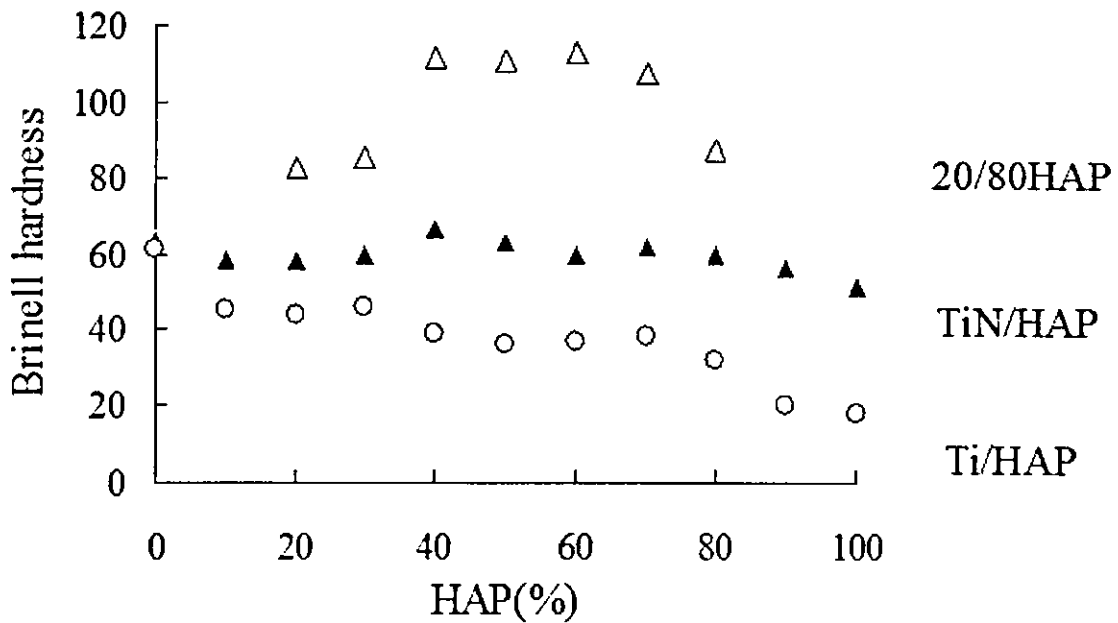


図8 Ti/HAP, TiN/HAP, TiN-20/80HAP 傾斜機能型インプラントの各部位におけるブリネル硬さ。

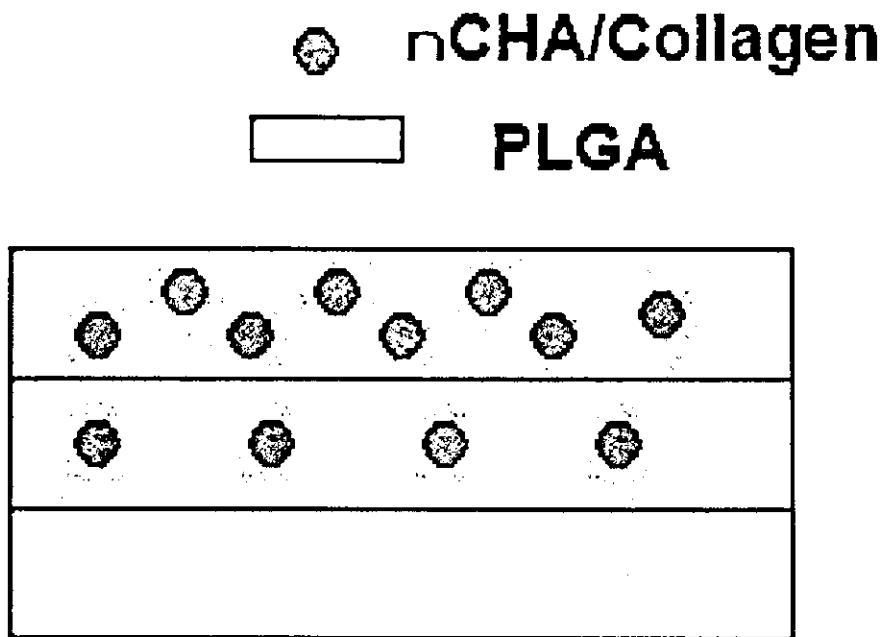


図9 傾斜機能型 GTR メンブレン膜の概念。nCHAC/PLGA(上面)から PLGA(下面)へ組成が傾斜的に変化する。



図10 3層構造の傾斜機能型 GTR メンブレン膜の断面像。上面：nCHAC/PLGA、下面：PLGA。

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、生体親和性やレセプター選択的接着能を付与するため CNT のアパタイトまたはカーボンナノファイバー (CNF) の糖鎖またはタンパク質による表面修飾を検討した。

その結果、生体親和性を付与するため多層カーボンナノチューブ (MWNT) をカルシウムおよびリン酸イオンを含む数種の緩衝液へ浸漬したところ、適度な過飽和度を持つ緩衝液を用いた場合には MWNT を核とした結晶物の析出が観察された。また、PBS (+) にて基質の影響を検討したところ、炭素系では直径 30nm の MWNT 上にて析出量が一番多いことが明らかとなった。

続いて MWNT と同様に CNF でも糖質高分子やタンパク質の吸着による表面修飾が可能か検討を行った。その結果、人工糖質高分子、アルブミン、コラーゲンはいずれも容易に吸着し、表面修飾が達成された。

以上の結果より、析出および吸着による CNT または CNF の表面修飾は、操作が簡便な上に適用できるカーボン基質の適用範囲が広いことためバイオ応用研究において様々な場面で有用であると考えられる。

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氣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応用研究が集中的に行われている。CNT のバイオ

応用を考えた場合、目的に応じて一本一本の独立したチューブとしての利用、または凝集体としての利用等、様々な形態における応用の可能性が考えられる。

はじめに、CNT のバイオ分野でのさらなる展開を目指し、生体親和性を付与するため CNT 表面上でのアパタイトの析出を検討した。

続いて、レセプター選択的接着性を付与するためカーボンナノファイバー (CNF) およびフ

ラーレン (C60) の糖鎖またはタンパク質による表面修飾を検討した。

B. 研究方法

－ MWNT 上でのアパタイトの析出 －

Ca-P 溶液の組成

・ Revised Simulated Body Fluid

NaCl (14.4 mM), KCl (2.0 mM), CaCl₂ (1.13 mM), MgCl₂ (0.29 mM), K₂HPO₄ (1.0 mM), KH₂PO₄ (1.0 mM) and/or NaF (1.2 mM). The pH was adjusted to 7.2 using KOH.

・ Standard Simulated Body Fluid

NaCl (7.996 g/L), KCl (224 mg/L), CaCl₂ (278 mg/L), MgCl₂ 6H₂O (305 mg/L), K₂HPO₄ 3H₂O (228 mg/L), NaHCO₃ (350 mg/L), Na₂SO₄ (71 mg/L), (CH₂OH)₃CNH₂ (6.057 g/L), 1M-HCl (40 mL) and/or NaF (1.2 mM). The pH was adjusted to 7.4 using KOH.

・ Saliveht (Artificial saliva)

NaCl (844 mg/L), KCl (1.2 g/L), CaCl₂ (146 mg/L), MgCl₂ (52 mg/L), K₂HPO₄ (342 mg/L), others and/or NaF (1.2 mM). The pH is 5.0~6.0.

・ Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

NaCl (8 g/L), KCl (400 mg/L), CaCl₂ (140 mg/L), MgCl₂ 6H₂O (100 mg/L), MgSO₄ 7H₂O (100 mg/L), KH₂PO₄ (60 mg/L), NaHCO₃ (350 mg/L), Na₂HPO₄ (48 mg/L), D-Glucose (1 g/L) and/or NaF (1.2 mM).

・ Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)

NaCl (8 g/L), KCl (200 mg/L), CaCl₂ (100 mg/L), MgCl₂ (47 mg/L), KH₂PO₄ (200 mg/L), Na₂HPO₄ (1.15 g/L) and/or NaF (1.2 mM). The pH was adjusted to 7.4 using KOH.

実験操作

新鮮な擬似体液 (100mL) へ MWNTs(NanoLab)または MWNTs(MTR)を 1 mg 加え、15 分間超音波処理し、出来る限り MWNTs を分散させた。その後、37℃にて任意時間静置し、遠心分離 (4000 rpm、10 分) または吸引ろ過にて MWNTs を分離後、脱イオン水にて洗浄した。分離した MWNTs 試料はカーボンコーティングを行い、走査型電子顕微鏡 (SEM、HITACHI S4000)にて表面観察を行った。

経時変化および基材の影響を検討するためには擬似体液として Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)を選択し、同上の操作にて任意時間静置した。

－ CNF への糖鎖、タンパク質の吸着 － 材料

PVLA : Poly-(N-p-vinyl benzyl-O-β-D-galactopyranosyl-(1 → 4)-D-gluconamide) (MW : 5 × 10⁴, 生化学工業)、FITC-PVLA : FITC-labeled PVLA (生化学工業)、Albumin from bovine serum(BSA) fluorescein conjugate(Molecular Probes,Inc.)、BSA Gold conjugate (20nmGold、British BioCell International)、FITC 標識 I 型 Collagen (牛皮 (真皮)、Yagai Corp.)

実験操作

人工糖質高分子およびタンパク質による CNF の表面修飾

CNF を PBS に加え濃度 25μg/500μL とし、超音波処理を 15 分間行った。この溶液に 10μg の蛍光ラベル化人工複合糖質高分子 PVLA (または BSA、コラーゲン) を加え、さらに 15 分間超音波処理を行い 30 分インキュベートした。

その後、遠心分離 (14,000rpm,10min) により CNF を底に集め、PBS×3回による洗浄を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察を行うため CNF 凝集体を少量の PBS に超音波を使用せずに分散させ、一部をスライドガラス上へ滴下し乾燥を防ぐためカバーガラスをした。CLSM 観察は、スライドガラス上で CNF の凝集体を探し、レーザー透過像(488nm アルゴン)、FITC 像(ex 488nm Ar, em 515-565nm) を得た。

同様な修飾操作にて BSA Gold conjugate を相互作用させた CNF はコーティングせずに SEM にて表面観察を行った。

人工糖質高分子による C60 の表面修飾

CNF を PBS に加え濃度 500 μ g/5 mL とし、人工複合糖質高分子 PVLA(1mg)を加え、さらに 20 分間超音波処理を行った(PVLA を加えず超音波処理したものをコントロールとした)。その後、溶液の分散状態を観察した。

C. 研究結果

－ MWNT 上でのアパタイトの析出 －

図 1 には NanoLab 社製 MWNT を R-SBF に 2 週間浸漬した後の MWNTs 凝集体表面の SEM 像を示した。浸漬前後での MWNTs 分散状態の観察の結果を図 2 に示した。図 2 (a) は PBS 浸漬後すぐに超音波処理し分散させた状態。図 2 (b) は、PBS 浸漬後、2 週間静置した状態。図 2 (c) は PBS 浸漬 2 週間後、攪拌した状態を示した。MWNT 上でのアパタイトの析出における擬似体液種の影響を検討した結果を図 3 および図 4 に示した。PBS (+) 中での析出における経時的変化の観察結果を図 5 および図 6 に示した。また PBS (+) 中での析出における基材の影響を観察

した結果を図 7 から図 10 に示した。

－ CNF への糖鎖、タンパク質の吸着 －

CNF へ蛍光ラベルした BSA を相互作用させ CLSM にて観察した結果を図 12 に示し、Gold ラベルした BSA を相互作用させ SEM 観察した結果を図 13 に示した。別のタンパク質として蛍光ラベル化コラーゲンを用いて CNF と相互作用させ CLSM 観察した結果を図 14 に、および蛍光ラベル化 PVLA を相互作用させた結果を図 15 に示した。

－人工糖質高分子による C60 の表面修飾－

C60 と PVLA を水溶液中で超音波処理し相互作用させ、分散状態を観察した結果を図 16 に示した。

D. 考察

－ MWNT 上でのアパタイトの析出 －

生体親和性を持つ物質での MWCNT 表面修飾を目指し、カルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液中からの MWNT 上でのアパタイト析出を検討した。

・擬似体液の組成

擬似体液である R-SBF へ MWNTs を浸漬すると MWNTs 表面より Ca-P の結晶が析出する (図 1)。しかしながら結晶形態や生成率において再現性が乏しいことが分かった。再現性の向上のため擬似体液組成の影響を検討することとした。擬似体液として試した種類として標準的な擬似体液 Standard Simulated Body Fluid、市販人工唾液 Saliveht (Artificial saliva)、使用頻度が高い擬似体液 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) および Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS(+)) を選択した。

MWNTs を加え 2 週間静置し SEM 観察を行った結果、今回検討した擬似体液中では PBS のみで明らかな析出が観察された (図 3、4)。このことは擬似体液であれば全てが析出を起こすのではなく、溶液組成が重要であることを示している。また、R-SBF が過飽和に近い溶液状態であることから、同様に過飽和度が比較的高い PBS(+) のみに析出が起こったと考えられる。一方、PBS(+) への F 添加効果を比較した結果、F を添加すると MWNT をコアとした針状結晶として析出し、添加しないと MWNT を含んだアモルファス状の析出であることが分かった (図 3a および b)。

・経時変化の検討

ここまでの析出では、十分析出平衡へ達するまたは近づくと考えられる 2 週間を基準にして検討を行ってきたが、2 週間では結晶が MWNT 凝集体のほぼ全ての表面に析出するため多くの情報を得ることができなかった。続いて PBS(+) を用いて経時変化を検討することとした。その結果、PBS(+) のみでは 1 日後の時点からフレーク状あるいはアモルファス状 (微細な針状の可能性もあり) の析出物 (図 5) が観察されたのに対し、F を添加すると明らかな針状結晶 (図 6) が観察された。このことより、F の添加は結晶成長の方向制御に寄与していることが考えられ、針状結晶の析出のためには F 添加が重要であることが分かった。また、SEM 観察では解像度に限界があるため明らかではないが PBS(+) のみの析出初期 (1 日後、2 日後) では微細な針状の形態で結晶成長している可能性がある。MWNT 特有のナノレベルでの析出である可能性があるため、今後透過型電子顕微鏡 (TEM) などによるより解像度が高い観

察が必要であると考えられる。

・基材の検討

上記析出が MWNT 特有であるかを検討するため、析出させる基材を変化させその影響を検討した。はじめに、カバーガラス、Carbon Plate、酸処理チタン、カーボンファイバー、MWNT (MTR)、MWNT (NanoLab)、SWNT を用い PBS (+) 中で 2 日間浸漬し析出を比較した。その結果 (図 7、図 8)、カバーガラス、Carbonplate、カーボンファイバー、SWNT 表面では比較的少量の析出が観察されたのみであるのに対し、酸処理チタン、MWNT (MTR)、MWNT (NanoLab) では多くの析出が観察された。また F 添加 PBS (+) でも同様な傾向が観察された。特に両溶液中でのカーボン系基材では、Carbonplate = SWNT < MWNT (MTR) < MWNT (NanoLab) の順で析出量が多くなり、基材の微細構造や表面の化学的性質が敏感に影響し、エッジや適度な直径を持つことが析出に適していることが推測された。SWNT は一本一本のチューブでは 1.2 nm の直径を持つが、表面エネルギー的に不安定であり 100nm-200nm のバンドルを形成し安定化することが知られている。よって析出の場合も、このバンドル構造が大きく析出に影響していることが推測された。

— CNF への糖鎖、タンパク質の吸着 —

CNT がタンパク質やある種の分子を吸着することが知られている。そこでチューブ状でない形態を持っている CNF も同様に吸着により、表面修飾が可能か検討を行った。

はじめに一般的なタンパク質である BSA を用いて吸着を検討した。蛍光ラベルされた BSA を CNF と相互作用させ蛍光顕微鏡 CLSM にて観察した結果 (図 13)、CNF の凝集体表面に蛍光が観

察された。次に、Gold ラベルされた BSA を用いて相互作用させ SEM 観察を行った結果(図 1 2)では、CNF 一本一本の表面に BSA の吸着を示す形状や Gold 粒子(直径 20nm)が観察された。続いて、繊維状のタンパクである Collagen を用いて CLSM 観察を行った結果(図 1 4)や人工糖質高分子 PVLA を用いた結果(図 1 5)でも同様に CNF 凝集体の表面に蛍光が観察された。

以上の結果より、MWNT と同様に CNF でもタンパク質を混ぜるのみで容易に CNF の表面修飾が可能であることが分かった。

—人工糖質高分子による C60 の表面修飾—

CNT や CNF 場合、人工糖質高分子 PVLA を混ぜるのみで表面修飾が可能であったが、この方法をフラーレン(C60)へ適用できるか検討をおこなった。フラーレンの懸濁水溶液に PVLA を加え超音波処理を行ったところ(図 1 7)、PVLA を加えていない懸濁液では溶液が透明であり分散しないのに対し、PVLA を加えた懸濁液では超音波処理後に溶液が茶色へと変化し部分的に分散を示した。このことは、外側に親水性、内側に疎水性を持つ PVLA(図 1 6)と C60 が疎水性部分にて相互作用したために分散性を示したと考えられる。よって、MWNT や CNF と同様に C60 も容易に PVLA で修飾できることが明らかとなった。

E. 結論

— MWNT 上でのアパタイトの析出 —

MWNT 上でのアパタイト析出による表面修飾を検討した結果、適度な過飽和度を持つ擬似体液へ浸漬させることにより容易に修飾が達成された。また、アパタイト析出の経時変化を検討した結果、約 1 日後より MWNT をコアとした

結晶の析出が形成されはじめ、その後徐々に結晶が成長していく様子が観察された。検討した条件中で結晶の形へ大きく影響を与えるのは F 添加であり、F 添加にて針状に成長し、F 添加なしでフレーク状である傾向が観察された。析出量には、基材の影響が大きく適度な太さの直径を持つ MWNT 上での析出が最も多かった。以上の結果より、適度な MWNT は結晶析出において有利であり、ナノレベルで制御できる結晶成長の可能性が示唆された。

— CNF への糖鎖、タンパク質の吸着および人工糖質高分子による C60 の表面修飾 —

吸着による表面修飾法の適用範囲を広げるため CNF および C60 をカーボン材料として検討を行った結果、MWNT と同様に容易に修飾できることが明らかとなった。この吸着法は、共有結合を形成させる化学的反應ではないので、カーボン材料系に広く適用でき有用であると考えられる。しかしながら、共有結合に比較し結合力が弱いために修飾物の使用目的によっては不利になると考えられる。今後は、化学的な共有結合による修飾法を適用可能にし、目的により要求される性質を満たす修飾法の展開が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1) ○赤坂 司、亙理文夫、佐藤義倫、田路和幸：カーボンナノチューブ表面のバイオミメティックコーティング：第 27 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム(東京、2004 年 7

- 月 28 日～30 日)、同講演要旨集、p. 201、2004
- 2) ○赤坂 司、宇尾基弘、亘理文夫
: バイオミメティックコーティングを用いたカーボンナノチューブの表面修飾: 平成 16 年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏季セミナー(郡山市、2004 年 7 月 31 日)、同講演予稿集、p. 10、2004
- 3) ○赤坂 司、宇尾基弘、大川昭治、菅原 敏、亘理文夫: バイオミメティックコーティングを用いたカーボンナノチューブの表面修飾: 第 44 回日本歯科理工学会(京都、2004 年 9 月 24 日～25 日)、同講演予稿集、2004
- 4) Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Yosinori Sato, Kazuyuki Tohji : Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition : 206 th Meeting of The Electrochemical Society (ECS) 、(Hawaii, October 3-8, 2004)、2004
- 5) ○赤坂 司、亘理 文夫: 複合糖質高分子によるカーボンナノチューブの表面修飾: 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004(つくば、2004 年 11 月 15 日～16 日)、同講演予稿集、p134、2004
- 6) Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Yosinori Sato, Kazuyuki Tohji : Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition : International Symposium of Tissue Response and Biomedical Application of Carbon Nanotubes, Nanofibers, and Nanoparticles (Matsushima, December 20, 2004)、2004
- 7) ○赤坂 司、宇尾基弘、亘理 文夫: バイオミメティックコーティングを用いたカーボンナノチューブの表面修飾
: 第 17 回代用臓器・再生医学研究会(札幌、2005
- 年 1 月 28 日)、2004
- 8) Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Yosinori Sato, Kazuyuki Tohji : Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition : International Symposium Cell Processing Engineering (Sapporo, February 4, 2004)、2004

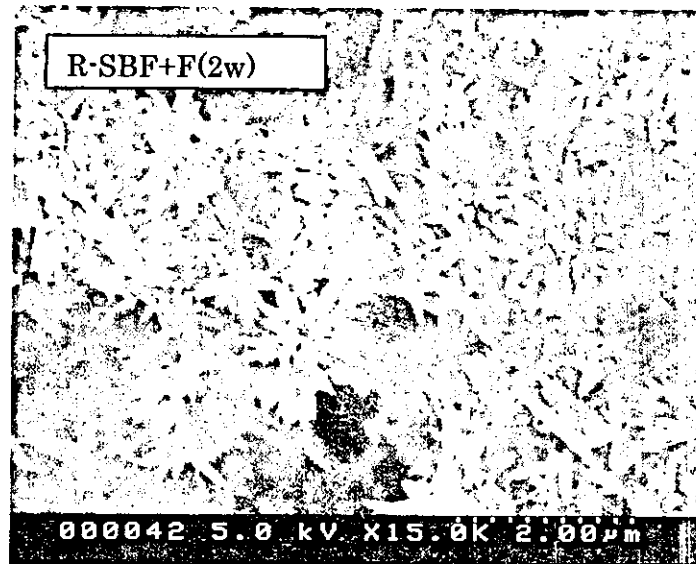


図1 R-SBF 処理した MWNTs (NanoLab) 表面での析出 (SEM 像)

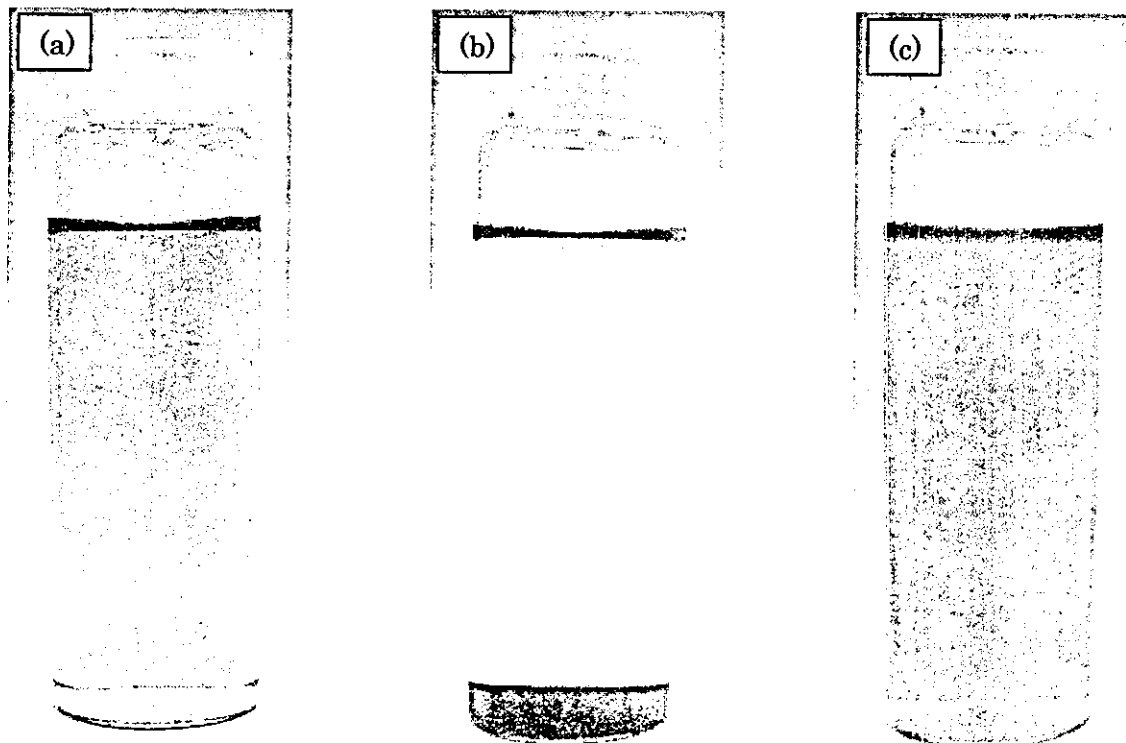


図2 PBS (または F 添加) で処理した MWNTs 分散状態の観察 (2 週間)

(a)PBS 浸漬後、すぐに超音波処理、(b)PBS 浸漬後、2 週間静置、(c) PBS 浸漬 2 週間後、攪拌