

②活性酸素産生量の測定

チトクローム C 還元法で、各検体を PMA (ホルボールミリスチン酸アセテート) で刺激して二波長分光光度計を用い好中球から産生された活性酸素産生量を測定した。

③サイトカインの測定

歯根膜細胞播種 2 時間後に、上清を採取し、ELISA 法で サイトカイン(TNF- α , IL-8, GM-CSF)量を測定した。

細胞播種 2 時間後 ELISA 法により好中球・マクロファージから放出された TNF- α , IL-1 β の産生量を測定した。

④細胞形態観察

経時的に反応している細胞を光学顕微鏡と SEM を使い観察した。

結果

1) *in vivo* での生体反応について

in vivo の実験で、細胞は自分より小さい数 μm 以下の粒子を取り込んでいた。このサイズの粒子は血管の拡張と PMN 細胞浸潤を伴う強い炎症反応を惹起した。化学的には安定でイオン溶出による刺激が小さいとされるチタンやセラミック、ポリマー、カーボンも物理的なサイズが影響したと考えられる炎症反応を生じた。周囲組織の炎症の強さと炎症の継続期間からバイオマテリアルであっても微粒子になると同一素材のバルクの材料に比べて細胞障害性が高いことが示された。特に数 μm 以下の微粒子では炎症細胞に容易に貪食されるため、炎症カスケードを引き起こしやすい。

2) *in vitro* 細胞培養試験の結果について

活性酸素の産生を強く促した。好中球は材料種の区別なく微粒子の大きさに反応したが、チタンに対するマクロファージ・線維芽細胞のサイトカインの産生量は同一粒径の二酸化チタンやポリ乳酸に比べ高い値を示した。また、好中球と同様マクロファージの反応もサイズ依存性を認め、数十 nm の微粒子には強く反応した。今回の実験からバイオマテリアルの生体為害性は材料の違いの他に、主として微粒子の物理的な大きさよって引き起こされる細胞の反応の違いが影響していることが示唆された。しかしながら、二酸化チタンや、カーボンナノカプセルでの実験で 200 ナノ以下のレベルの粒子を用いた場合、2 次粒子の生成を抑えることで細胞への刺激が小さくなる可能性も示唆された。

①ナノ・マイクロ微粒子のラット皮下埋入試験

3 日後にはチタンは肉芽組織に被包されており、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、周囲組織には壊死組織などは観察されなかった。粒子の周囲にはサイズが小さいほど血管の拡張や好中球の浸潤を認めた。4 週後では、線維性結合組織に被包されていたが、粒子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。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 3 μm 以下の粒子は貪食しており、10 μm 以上のチタ

ン粒子には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。

長期的な影響はまだ解析中ではあるが、一つの傾向が現れた。ある一定の濃度で播種されたバイオマテリアルの粒子は組織中で長期にわたり排出されずに残留する。短期的に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。しかしながら多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、局所で線維組織に被包化され安定化される。この場合、化学的影響がなければその周囲の炎症反応は沈静化しており、組織学的には生体為害作用を示さなかった。

粒子の体内での移動は小さな粒子になると血管内皮細胞にも及んでおり組織間隙から血管・リンパに流出し全身を回る可能性が示唆された。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。しかし拡大像では、組織間隙に粒子が広く分布していた。また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。

②in vitro での細胞の観察

ヒト好中球・ラットマクロファージ・ヒト歯根膜由来線維芽細胞を採取し in vitro の実験・観察を行った。マクロファージは in vitro でも in vivo の実験同様に粒子を認識し貪食した。

粒子に向かって細胞が移動するだけでなく、粒子が細胞に付着したり、細胞の周りに粒子が集まって凝集する反応も認められた。また二次粒子を核として細胞が多数集積していた。

線維芽細胞系も粒子を取り込んだ。浮遊させた歯根膜由来細胞と微粒子を混和して培養したところ細胞は微粒子を取り込み生着した。細胞外基質や細胞の起点が粒子になっている様子が観察された。また、細胞をトリプシン処理したところ細胞内粒子を保持したまま浮遊細胞になった。この細胞を培養すると生着し増殖した。光学顕微鏡での観察では 0.5、3 μ m の粒子に対しては貪食像を認めた。微粒子存在下では増殖は抑制されていた。

ヒト好中球は微粒子と混和すると細胞に付着した微粒子を取り込む他、その刺激によって様々な生理活性物質を放出する。反応している細胞の表面性状は変化しており、活性化されていることがわかる。その後好中球は萎縮し細胞死を起こすものも認められた。

③in vitro での細胞の反応

細胞生存率

コントロールおよび 10 μ m 以上の大きさのチタンと比較して、10 μ m 以下のチタンや二酸化チタンやポリ乳酸と混和した好中球の細胞生存率は低い傾向が認められた。細胞生存率は明らかなサイズ依存性を示し、粒子が小さいほど生存率は低下した。3 μ m のチタン微粒子に対する 24 時間後の増殖率は、粒子濃度に依存した。また、細胞増殖率は微粒子の存在下ではコントロールと比べ、有意に低下した。

乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性値

コントロールおよび 10 μ m 以上の大きさのチタンと比較して、10 μ m 以下のチタンや二酸化チタンやポリ乳酸と混和した好中球から逸脱した乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性値は高い傾向が認められた。

活性酸素産生量

コントロールおよび 10 μ m 以上の大きさのチタンと比較して、10 μ m 以下のチタンや二酸化チタンやポリ乳酸と混和した好中球からの活性酸素産生量は高い傾向が認められた。

サイトカイン放出量

コントロールおよび 10 μ m 以上の大きさのチタンと比較して、10 μ m 以下のチタンや二酸化チタンやポ

リ乳酸と混和した好中球からの TNF- α , IL-1 β の放出量は高い傾向が認められた。サイトカイン TNF- α , IL-8 の放出量はコントロールに比べ有意に高かった。歯根膜細胞は微粒子が小さいほどサイトカインを多量に放出し、特に3 μ m 以下で顕著であった。

サイトカインの放出量を元にして、濃度依存性を調べた 10⁻³mg/ml を超えると粒子は集積してしまうため本来の粒子径で実験できていない。しかしながら粒子の濃度に依存して細胞の反応が強くなる傾向が認められた。

また、歯根膜由来線維芽細胞の増殖率を調べたところ、細胞は貪食可能な粒子径になると増殖が抑えられた。むしろ 10 μ m 粒子に対しては増殖の影響は少なく、粒子を起点に細胞が生着する様子が観察された。

微粒子に対する生体反応は生体のサイズとの関係となることが理解された。これまでの実験結果で考えられる微粒子と生体のサイズの関係をまとめた。

④CNF について

埋入後3日で、試料の大きさは数十〜100nm を保ち、肉眼や光学顕微鏡レベルでは観察されない。しかしながら、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。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。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 週間後、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。1週間後と比較し CNF 粒子の凝集の程度は弱くなり分散する傾向を示した。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。

細胞の反応を調べるため、ラットマクロファージとヒト歯根膜細胞をもちいてサイトカインの検出を行った。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。そこで炎症反応に対する影響を確認した。サイズによる影響をみるため CNF は 220,550,670nm の各サイズを生理食塩水中に分散させて用いた。ただし、実験後 670nm の CNF は凝集が生じていた。結果からは細胞が反応するサイズであることが確認された。各結果からは 220nm の粒子では反応が小さくなっていった。

考察

生細胞を使った生化学的アッセイにおいて 3 μ m 以下の微粒子に対し、サイトカイン・活性酸素が有意に検出され、光学・電子顕微鏡による観察では、3 μ m 以下のチタン微粒子の貪食が認められた。一方、10 μ m 以上の微粒子に対しては細胞の著名な反応は認められなかった。動物埋入試験において 50 μ m 以上のチタン粒子に対しては急性の炎症症状も穏やかで、長期的には線維性結合組織で覆われ安定した。一方、3 μ m 以下の粒子に対しては強い炎症反応が生じ、長期間反応が持続した。実験から 50 μ m 以上のチタン粒子で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、10 μ m 以下の粒子では炎症反応を惹起し、長期間にわたり強い炎症反応を引き起こすことが示唆された。ICP 元素分析から、チタン微粒子からのイオン溶出は認められなかったため、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示すことが示された。生体親和性の高い他のバイオマテリアルも同様にサイズ効果が現れることが予想され、各種材料を用い実験した。第一に構成物質による反応の差異を、金属、セラミックス、ポリマー、カーボンナノチューブを対象とし、同じ手法で比較

した。その結果、イオン溶出する金属もサイズ依存性を示し、サイズが小さくなるほど細胞反応は強くなり、細胞生存率は有意に低下した。しかし、ニッケルのイオン化による細胞障害作用に比べ、鉄はあまり細胞に影響を与えなかった。生体内で無反応であるセラミックスや吸収されるポリ乳酸も $3\mu\text{m}$ 以下になると細胞が反応し、構成物質による反応の違いも認められた。第二に生細胞に反応を惹起させる臨界寸法を測定することを目的とし生化学的アッセイを行った。結果として 50nm の二酸化チタン微粒子に対しても細胞は反応し、サイトカイン等の放出を検出した。細胞が無反応となる粒子は 50nm 以下であることが示唆された。第三に粒形による炎症反応の違いを二酸化チタンの球状粒子とカーボンナノファイバーを用いて調べた。針状の粒子は同じサイズの球状粒子に比べると有害性が強く、炎症性サイトカインの放出は有意に高かった。また、針状の粒子もその大きさによるサイズ効果が認められた。ただ、材料の種類による違いもナノレベルの粒子では大きな要因となると考えられた。

微粒子の存在下で歯根膜細胞の生存率や機能は影響を受け、生存率・増殖率の低下およびサイトカイン放出量の上昇と物理的なサイズ依存性を認めた。特に細胞が粒子を取り込む $3\mu\text{m}$ 以下と $10\mu\text{m}$ 以上の間に有意差を認めた。マイクロ・ナノ微粒子は歯根膜由来細胞の生存・増殖に影響を与え、また周囲組織に対して、生体為害作用を引き起こす可能性があると考えられる。

一般に好中球は、種々の刺激に対しては炎症反応を起こし活性酸素やサイトカインを放出し、また貪食やアポトーシスを起こしたり、損傷した際には逸脱酵素であるLDHを放出することが知られている。そこで本研究では好中球の機能を用いて、微粒子の生体親和性や有害性について研究した。

細胞生存率およびLDH活性値から、 $10\mu\text{m}$ 未満の微粒子は細胞有害性が高く、活性酸素産生量、サイトカイン放出量から $10\mu\text{m}$ 未満の微粒子に対して好中球は炎症反応を起こしていることが示唆された。これは好中球の大きさは約 $10\mu\text{m}$ であり、この細胞の大きさよりも小さい微粒子に対しては、好中球が反応していることを示している。このことから微粒子の生体親和性はサイズに依存することが示唆された。CNT、CNRは好中球よりも小さく、単体では正常細胞に影響を与えることが考えられるため、バイオ応用を考える際には炎症を惹起させることを利用した応用か、生体に対して免疫を抑制するなどの工夫を行った後の応用が必要と考えられた。

以前の研究からは細胞生存率・LDH活性値から、Ni粒子は細胞障害性が高いことが示された。Niはイオン化することで細胞を障害する。ICPでNi粒子を入れた直後の溶液を測定したところ、Niは生理食塩水中ですぐにイオン化し拡散していた。したがって、Ni $0.5\mu\text{m}$ 粒子がNi $5\mu\text{m}$ 粒子よりも細胞障害性が高かった原因は、粒子が小さいほど総表面積が大きくなるため、イオン化が進みやすかったことが考えられる。一方、FeはNiよりもイオン化するが、細胞生存率は100パーセントに近く、Feの生体為害性はイオンによるものではないことが示された。また、細胞より小さな金属微粒子はそれ以上の大きさの粒子との間にLDH活性値で有意差を認めることから、細胞障害作用をもつものと考えられる。細胞機能性試験によりTi・Fe粒子はサイズが小さいほど、好中球を刺激し活性酸素・サイトカイン産生を促した。特に $2\mu\text{m}$ 以下の金属微粒子に対して活性酸素・サイトカイン産生量が著明であったが、これは粒子大きさが、好中球に貪食されるサイズであるためだと考えられる。同じ粒径のTiとFe粒子の産生量に有意差はなかった。これは、好中球が金属種の区別なく反応したためであろう。金属微粒子の生体為害性は、活性酸素による組織の障害と、サイトカインによる金属粒子周囲の炎症によるものが考えられる。ラットを使った病理組織学的検索では、好中球・マクロファージによる金属微粒子を貪食と金属粒子周囲の組織の炎症反応を観察した。これはin vitroでの実験から考えられた生体為害生の発現機序を支持する結果である。このようにイオン化しにくいTiやイオン化しても細胞障害性が低いFeといった金属も、粒子が細胞より小さい場合には生体為害性をもつことが示された。Niのような金属は、組織内に溶出した金

属イオンが細胞を障害することで生体為害性を発現する。それに加えて、今回の実験で、金属の生体為害性は金属微粒子のよって引き起こされる炎症反応が関与していることと、生体為害性は金属微粒子の大きさに影響されること示唆された。

今回の実験ではそれをさらに進め、一般に生体親和性が優れているとされている生体材料も微粒子の場合には生体親和性が異なることが予想した。しかし、これまで、生体材料の微粒子が、生体にどのような影響を及ぼすかについては、まだ十分に検討されていない。今回われわれは、顎口腔領域で使用されることの多い金属微粒子や生体吸収性ポリマー微粒子とバイオ応用を目標としているナノカーボン新素材の生体親和性についての検討を行った。

またもう一つの研究目的であったインプラントの摩耗粉の組織への影響を検索からも、生体親和性の高い材料もナノ・マイクロ微粒子になると炎症反応を惹起することを報告した。組織反応はサイズ依存性を示し、特に細胞より小さい $3\mu\text{m}$ 以下の微粒子は強い生体反応を起こした。これはマクロファージ・好中球の貪食反応の関与によるものと考えられる。一方、歯根膜細胞は侵襲を受けたり、食細胞として働くことでサイトカイン等を放出し、炎症反応や骨のリモデリングを亢進させる。微粒子に対する歯根膜細胞の反応を解析することは、歯の再生における炎症反応の制御・骨の誘導にとって重要である。

結論

ナノ・マイクロ微粒子の *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実験を行い、以下の結論を得た。本年度においては、*in vivo*・*in vitro* 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、低侵襲の医療用のナノバイオマテリアルの開発を目的とした基礎データ収集を行った。

1. 微粒子の生体親和性および為害性はサイズに影響されることが示唆された。また、その為害性は細胞の炎症反応が関与していることが示唆された。
2. 化学的に影響を及ぼさないバイオマテリアルの微粒子はマクロの材料とは異なり炎症反応を惹起する。長期的には炎症症状は沈静化するが、微粒子は残留する。さらに小さなナノ粒子になると生体の防御機能を免れ全身に拡散する可能性がある。
3. 微粒子に対する細胞の反応はサイズによって影響を受ける。その一番大きな要因としては細胞が取り込むことが可能な大きさかどうかということである。次に粒子自体の問題が考えられた。ナノ・サブミクロン粒子は凝集して二次粒子を作ったり、静電的な力によると考える細胞膜への集積を認めた。この結果貪食できる大きさになったり、細胞膜への刺激になったりすると考えられた。
4. 微粒子が異物反応を誘発した場合、マクロのバイオマテリアルとは異なり炎症反応を惹起し、周囲組織に損傷、創傷治癒の遅延をおこしうることが示唆された。
5. 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取り込まれた。細胞内で粒子を反応させる手法が期待された。
6. カーボンナノチューブ (CNT) およびカーボンナノファイバー (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。長期に持続する強い炎症反応は惹起しなかった。
7. CNF の多くはマクロファージや異物巨細胞に貪食される。CNF が異物として生体反応を惹起する。その反応は他バイオマテリアルと比較すると弱く、バイオマテリアルとしての利用が可能であると考えられた。

カーボンナノチューブを利用した再生医療 —生体材料scaffoldへの応用—

北海道大学大学院歯学研究科

○柏崎晴彦・高師則行・田村一央・木浦和人・戸塚靖則・井上農夫男

1. 目的

組織再生に不可欠な3つの要素は、細胞、液性因子（成長因子）、そして細胞の足場scaffoldである。

scaffoldの表面を化学修飾することでscaffoldの高機能化が期待できる。例えば、scaffoldの表面に修飾剤を固定し、その修飾点に再生に重要な液性因子をリガンドとして固定できれば、液性因子の徐放化により効率のよい再生医療が可能になる。カーボンナノチューブがscaffoldの表面修飾剤として機能できれば、その再生医療に対する応用範囲は広がる。

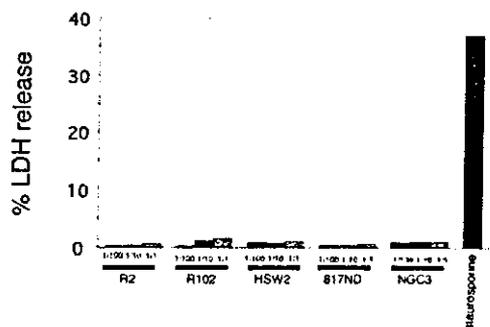
scaffoldの役割と求められる特性は、1) 細胞接着の場、2) 再生組織の形態の決定と再生の場の確保、3) 生体吸収性、4) 生体に悪影響をあたえないこと、である。そこで、まず4) に関するカーボンナノチューブの影響を検討した。

2. 実験方法

まずカーボンナノチューブが生体の細胞に対し細胞死を誘導するか否かを調べた。

ヒト由来マクロファージ系細胞株であるTHP-1細胞を、500 μ lの10%牛胎児血清添加RPMI1640培地と共に 1×10^5 個ずつ24穴マイクロプレートに播種し、20 μ lのカーボンナノチューブ懸濁液の原液、10倍希釈液、100倍希釈液で24時間刺激した。遠心により上清を集め、LDH assayにより細胞死の有無を調べた。

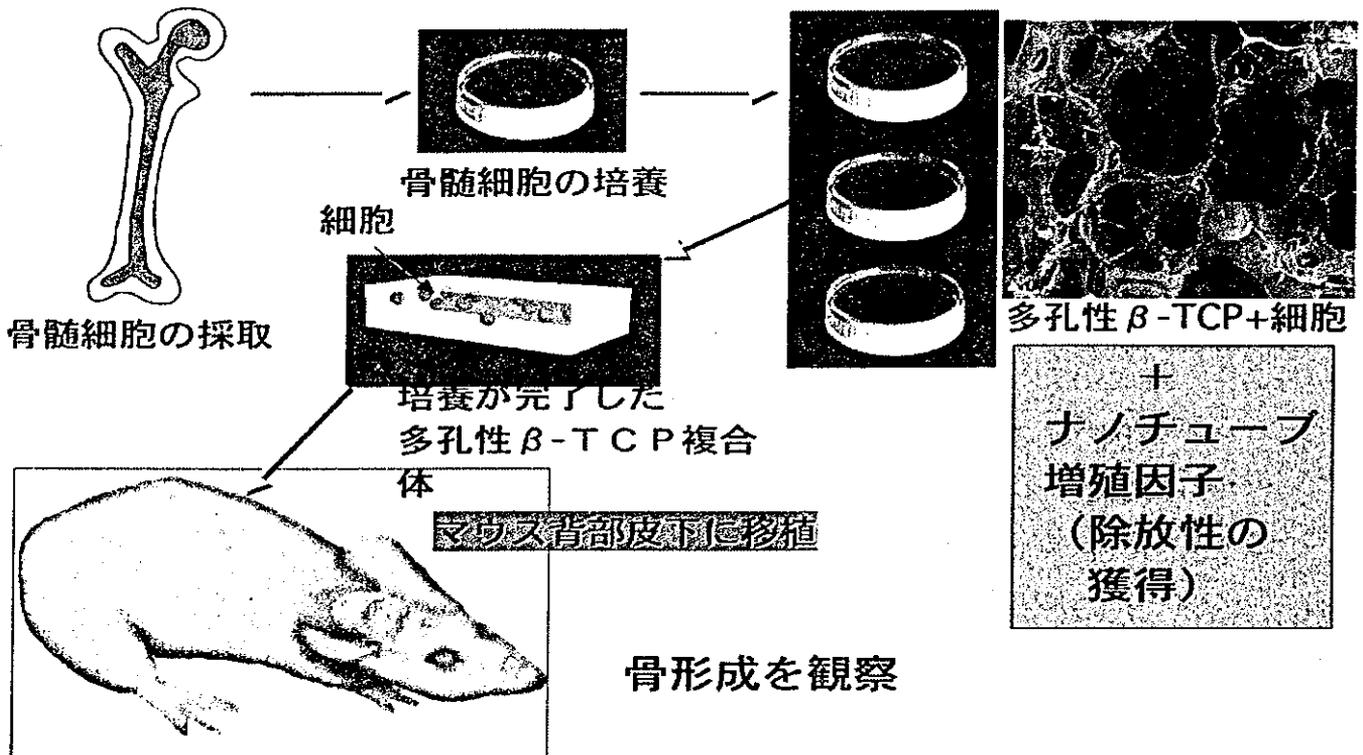
カーボンナノチューブならびにナノロッドによる細胞死の誘導



3. 結果・今後の展望

現在assayの至適条件を決めている段階で結果がまだでていないが、発表当日には結果を示したいと思う。カーボンナノチューブの細胞への傷害性がないことが確認できたなら、顎骨再生を念頭に置いて研究を進めたいと思う。その場合、scaffoldを生体吸収性の β -TCPとし、その表面をカーボンナノチューブでcoatingして、BMP等の増殖因子との複合体の作成が可能か検討したいと考えている。

培養骨形成のストラテジー



水溶性カーボンナノチューブの分散とそのサイズ依存性

東北大学大学院環境科学研究科

佐藤義倫、田路和幸

1. はじめに

生体内の細胞には様々な大きさのものが存在する。それらの細胞とナノチューブの相互作用を調べるためには、細胞に見合ったナノチューブの長さ制御が必要である。これまでに、我々はカーボンナノチューブ (MWCNTs) を強酸中で超音波照射することによって切断し、それらの表面に水酸基、カルボキシル基などの親水基を修飾させ、水溶性カーボンナノチューブを調製できることを報告してきた。本研究では、これらの切断されたMWCNTsを様々なポアサイズを持つメンブランフィルター (membrane filter) により濾過し、MWCNTsのサイズ分離を行った。また、各々のサイズ分離されたMWCNTsに修飾されている官能基をFT-IRで同定し、水とPBS溶液に対する分散性をUV-VISにより評価した。

2. 実験方法

MWCNTs の精製・切断 NanoLab社のCVD法で合成された純度80%、直径20-40 nm、長さ5-20 μm のMWCNTsを使用した。MWCNTs 300 mgを大気中、773 Kで90分間燃焼し、その後、燃焼物を6M-HCL 300 mLに入れ、333 Kで12時間静置させ金属微粒子を除去する。この溶液を0.1 μm のPTFE membrane filterで濾過し、大気中、333Kで乾燥させる。上記で精製されたMWCNTs 100 mgを濃硫酸：濃硝酸=3：1 (v/v %) の混合液 100mLに入れ、超音波を5時間照射する。照射後、100 mLの蒸留水を加え、0.1 μm のPTFE membrane filterで濾過する。濾過物の洗浄は濾液が中性になるまで行い、洗浄後の濾物は大気中、333Kで乾燥させる。切断されたMWCNTs中に残っている不純物は、EDXとICPから見積もった。

MWCNTs のサイズ分離 上記で切断されたMWCNTs 10 mgをエタノール 1000 mLに入れ、1時間超音波照射する。照射後、ナノチューブ分散エタノール溶液をポアサイズ 37 μm のメッシュ、2.0 μm PC membrane filter、1.2 μm PC membrane filter、0.8 μm PC membrane filter、0.4 μm PC membrane filterの順番で濾過し、サイズ分離する。サイズ分離されたMWCNTsは大気中、333Kで乾燥させる。

切断MWCNTs のキャラクターゼーション 切断MWCNTsの構造は、SEM、TEMにより観察した。SEM観察はHitachi S-4100 Scanning Electron Microscopeを用い加速電圧5kVで行い、

TEM観察では加速電圧200kVのHitachi HF-2000 FIELD EMISSION Transmission Electron Microscopeを用いた。切断MWCNTsに化学修飾されている官能基はFT-IRにより同定した。FT-IR測定はThermo Nicolet Avtar 360を用い、KBrに試料を混ぜて透過法によって測定した。切断MWCNTsの分散安定性はUV-VISにより評価した。各々のサイズ分離したMWCNTsを水、PBSに対して濃度0.1 mg/mLに調整し、それぞれのスペクトルの吸収波長255 nmの吸光度を時間に対してプロットすることにより、分散性を評価した。

3. 結果と考察

切断されたMWCNTsの長さは1 μm 以下のサイズであり、水やエタノールなどの極性溶媒によく分散した。TEM観察から、MWCNTsの表面（多層ナノチューブの最外層）はダメージがあり、その部分にカルボキシル基、水酸基、アルデヒド基が導入されていると推測される。一方、内側の層はダメージが観察されず、002面の格子像が鮮明に観察されたことから、結晶性が良いと考えられる。

図1はサイズ分離した切断MWCNTsのSEM像と長さ分布である。a、b、cの順で1.2 μm フィルター濾過物、0.8 μm フィルター濾過物、0.4 μm フィルター濾過物である。平均長さは670 nm、550 nm、220 nmであり、

フィルターのポアサイズが小さくなるにつれて分離されたナノチューブの長さが短くなっていることがわかる。これらのサイズ分離した切断MWCNTsは水やエタノールの極性溶媒には極めて分散が良いが、PBSなどの Na^+ 、 K^+ を含む溶液に対して分散が悪く沈殿を生じることがわかった。

当日の報告会では、切断されたMWCNTs中に残っている不純物金属量、サイズ分離した切断MWCNTsに化学修飾している官能基の同定と分散安定性に焦点を絞って発表する予定である。

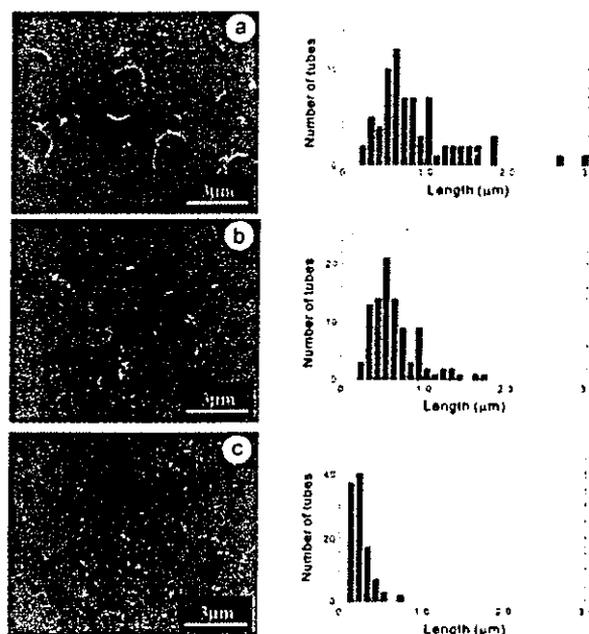


図1 サイズ分離した切断MWCNTsのSEM像と長さ分布。(a) 1.2 μm フィルター濾過物。(b) 0.8 μm フィルター濾過物。(c) 0.4 μm フィルター濾過物。

カーボンナノ物質の生体材料への応用

- *in vivo* でのカーボンナノチューブ, カーボンナノチューブ固化体
およびカーボンナノファイバーに対する反応-

北海道大学大学院歯学研究科 ○横山敦郎, 山本悟, 王蔚, 青木尚史,

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

東北大学大学院環境科学研究科 佐藤義倫, 田路和幸

東北大学大学院工学研究科 山本剛, 大森守, 橋田俊之

1. 緒言

これまでの研究発表会において, 我々はカーボンナノチューブ (CNTs) およびカーボンナノファイバー (CNFs) の生体反応について光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて観察しその結果を報告してきたが, これらの CNTs や CNFs は, 長さが制御されてはおらず, 様々な長さが混在したものであった. 異物に対する細胞の反応には異物の大きさが関係すると考えられており, *in vivo* においても同様の報告がなされている. 今回の発表においては, *in vivo* での反応に与えるカーボンナノ物質のサイズの影響を明らかにすることを目的に, 長さが一定に制御されたカーボンナノ物質に対する生体反応を検索した. 同時に骨補填材を目的に作製した SWCNTs および MWCNTs 固化体の組織反応を検索した.

2. 材料および方法

1) 材料

(1) サイズ制御 CNFs および CNTs

- ① CNTs : 平均長さ 220nm および 825nm
- ② CNFs : 平均長さ 400nm および 1200nm

東北大田路研佐藤先生より供与.

(2) CNTs 固化体

- ① SWCNTs 固化体 : 1000℃, 120MPa で SPS にて焼結
- ② SWCNTs+phenol resin 固化体 : 結合材として phenol resin を 50mass% 添加し, 1000℃, 120MPa で SPS にて焼結
- ③ グラファイト : コントロールとして使用
- ④ MWCNTs+polycarbosilane 固化体 : 結合材として polycarbosilane を重量比 5% および 25% 添加し, SPS にて焼結圧 120MPa, 焼結温度 1200℃ で焼結

①~③は, 東北大橋田研山本先生より, ④は, 東北大大森先生より供与.

2) 方法

サイズ制御 CNTs および CNFs については、8 週齢雄性ウイスター系ラットの腹部皮下に埋入し、1, 4 および 16 週後に灌流固定後、摘出し光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。

固化体については、1x1x5mm に調整した試料を 14 週齢雄性ウイスター系ラットの腹部皮下に埋入し、1, 4 週後に摘出し光学顕微鏡にて観察した。

3. 結果

1) サイズ制御 CNTs について

(1) 220CNTs : 埋入 1 週後では、大きな塊状の CNTs は、異物巨細胞を含む肉芽組織に被包されていた。塊となっていない CNTs は、マクロファージや線維芽細胞内に観察された (Fig. 1, 2)。4 週後では、CNTs を貪食したマクロファージや異物巨細胞が集積し、周囲に肉芽組織が観察された。マクロファージ内の CNTs の量は、1 週後に比較し増加する傾向が認められた (Fig. 3, 4)。

(2) 825CNTs : 1 週後では、CNTs は肉芽組織に被包されており、マクロファージによる貪食が観察された (Fig. 5, 6)。比較的大きな塊状の CNTs 周囲には異物巨細胞が観察された。炎症の程度は、220CNTs に比較しやや強い傾向を示した。16 週後においても、異物巨細胞が多数認められ、いわゆる肉芽腫性炎の状態を呈していた (Fig. 7, 8)。

2) サイズ制御 CNFs について

(1) 400CNFs : 埋入 1 週後においては、大きな塊の CNFs は、線維性結合組織に被包されていたが、多くの CNFs はマクロファージや線維芽細胞に貪食されていた。肉芽組織はほとんど観察されず、炎症は CNTs に比較し軽微であった (Fig. 9, 10)。16 週後では、CNFs を貪食したマクロファージの集積が観察されたが、被膜はほとんど認められなかった。血管内皮細胞、線維芽細胞内およびコラーゲン線維に沈着している CNFs も観察された。マクロファージや線維芽細胞内の CNFs は、1 週後に比較し小さな顆粒状の形態を示すものが多く認められた (Fig. 11, 12)。CNTs で観察された肉芽組織は観察されなかった。

(2) 1200CNFs : 1 週後においては、400CNFs と同様にマクロファージや線維芽細胞に貪食されている CNFs が多数認められたが、貪食されていない CNFs も 400CNFs に比較し多く観察された (Fig. 13, 14)。炎症は軽微であるが、400CNFs に比較しやや強い傾向を示した。16 週後においては、400CNFs とほぼ同様の所見を呈し、マクロファージや線維芽細胞内に小さく顆粒状になった CNFs が観察

された (Fig. 15, 16).

3) CNTs 固化体について

(1) SWCNTs 固化体

埋入 1 週間においては、固化体は細胞成分の多い線維性結合組織に被包されていた。結合組織内には、炎症性の円形細胞が観察された。一部に顆粒状の SWCNTs を貪食したマクロファージが観察された。MWCNTs に比較すると、炎症反応はやや強い傾向を示した (Fig. 17)。埋入 4 週では、基質化が進み、固化体は細胞成分の少ない薄層の線維性結合組織に被包されていた。

(2) SWCNTs+Phenol 固化体

1 週間において固化体は、毛細血管と炎症細胞を多く含む線維性結合組織に被包されていた。炎症の程度は SWCNTs 固化体より強い傾向を示した (Fig. 18)。

(3) グラファイト

1 週間において、グラファイトは細胞や拡張した毛細血管に富む肉芽組織に被包されており、CNTs 固化体に比較し強い炎症反応が認められた (Fig. 19)。4 週間後では、炎症は消退し、薄層の線維性結合組織に被包されていた。固化体と同様に、結合組織内に遊離した顆粒状のグラファイトを貪食するマクロファージが観察された。

(4) MWCNTs+polycarbosilane 固化体

1 週間においては、間葉細胞および線維芽細胞を含む線維性結合組織に被包されており、マクロファージに貪食された顆粒が観察された。炎症は比較的軽微であったが、PCS の含有量が多いほうが、炎症反応はわずかではあるが強い傾向を示した (Fig. 20)。

4. 考察

1) サイズ制御 CNTs および CNFs について

多様なサイズが混在した CNTs や CNFs について、これまで皮下組織に対する組織反応を検索してきたが、光顕的にはともにいわゆる肉芽腫性炎が認められた。本研究において、サイズ制御された CNTs および CNFs に関して同様に皮下組織へ埋入し、組織反応を検索したが、CNTs と CNFs の間には差が認められた。また、CNTs, CNFs とともにサイズが大きいほうが、炎症反応は強い傾向が認められた。CNFs に関しては、異物巨細胞を含む肉芽組織はほとんど認められなかったが、CNTs においては埋入 16 週間においても異物巨細胞が多数認められ肉芽腫性炎を呈しており、炎症反応は CNTs のほうが強いことが明らかとなった。この

原因としては、貪食の程度の差が考えられる。前回までの多様なサイズの CNFs には、ミクロン以上の大きな CNFs が含まれていたことから、マクロファージに貪食されないものがかかり認められたが、今回は塊状に凝集している CNFs を除きそのほとんどが、マクロファージや線維芽細胞に貪食されていた。また、16 週においては、CNFs が血管内皮細胞内にも認められたが、この結果からは血管内への遊離の可能性が推察される。一方、CNTs は、マクロファージにより貪食されないものもあり、これが長期にわたる肉芽腫性炎の原因となったものと考えられる。これらのことから、炎症に関しては、サイズのみでなく形態も関係するものと考えられた。

2) CNTs 固化体について

CNTs の固化体については、結合材を含まないもののほうが、炎症反応は軽微であることが示された。結合材の種類も影響し、phenol resin より polycarbosilane のほうが炎症は少ないことが明らかとなった。結合材を含まない固化体については、MWCNTs のほうが SWCNTs に比較し炎症は軽微である傾向を示したが、例数が少ないため、今後さらに検索する必要があるものと思われる。

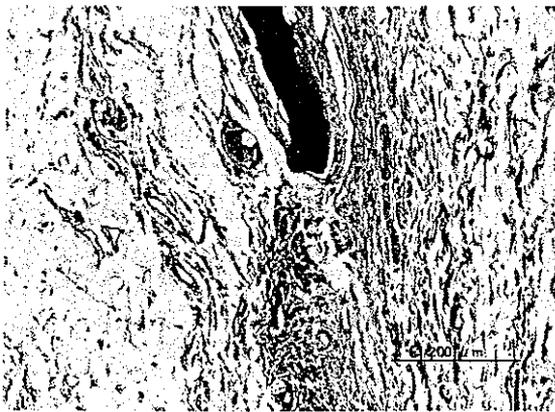


Fig. 1. 220CNTs 1W

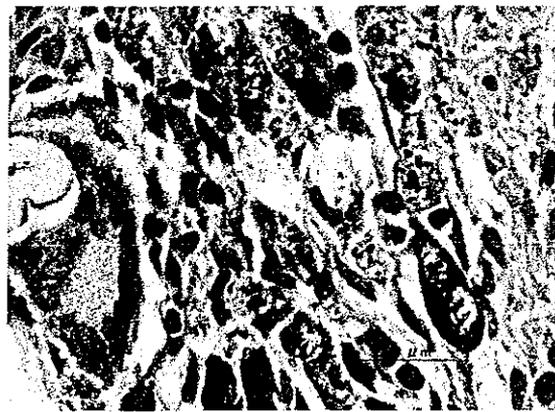


Fig. 2 220CNTs 1W

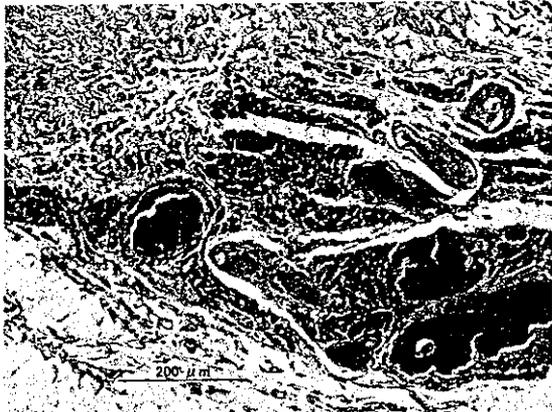


Fig. 3 220CNTs 4W

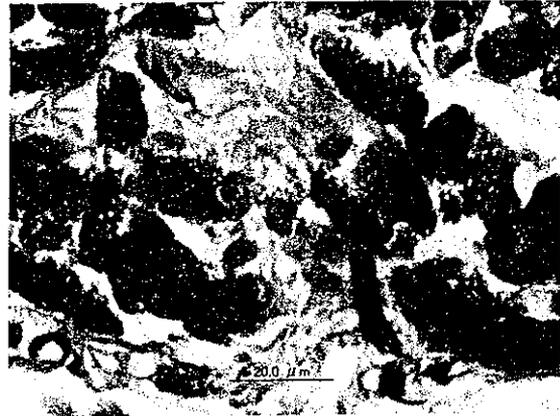


Fig. 4 220CNTs 4W

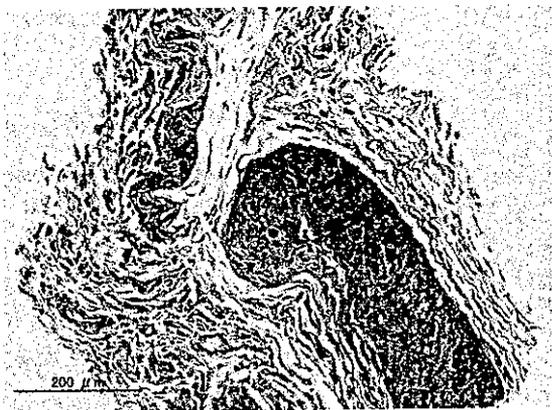


Fig. 5 825CNTs 1W

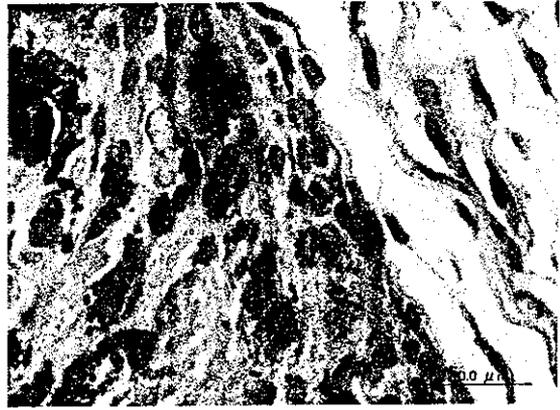


Fig. 6 825CNTs 1W

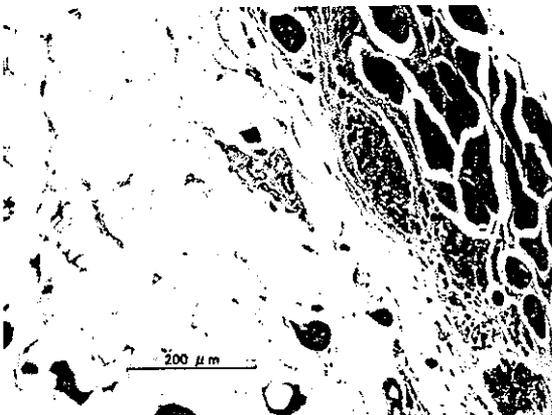


Fig. 7 825CNTs 16W

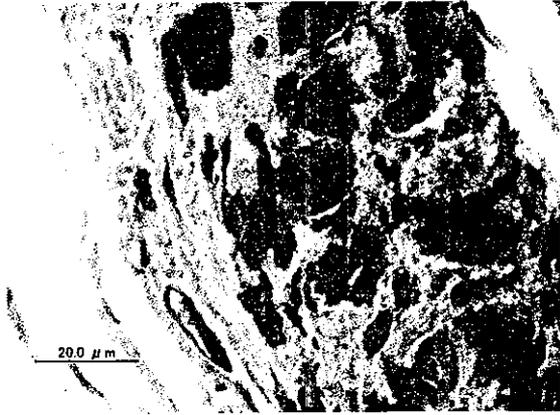


Fig. 8 825CNTs 16W

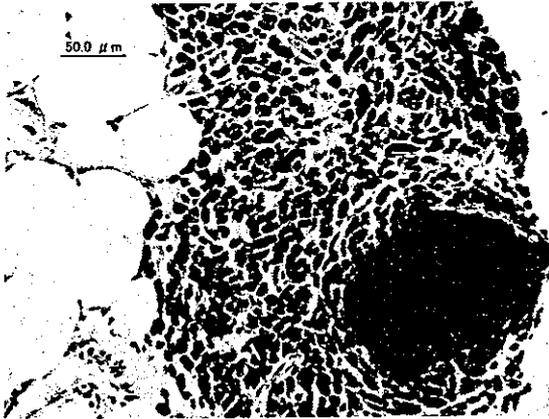


Fig. 9 400CNFs 1W

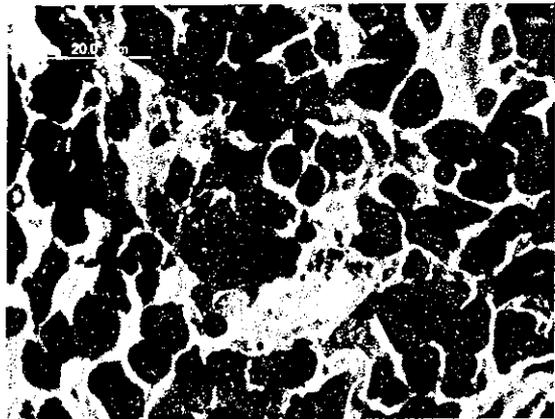


Fig. 10 400CNFs 1W

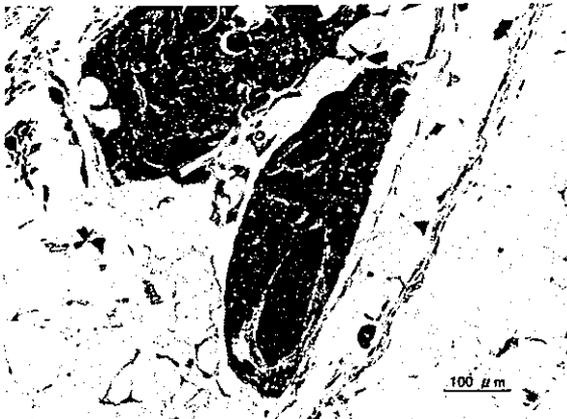


Fig. 11 400CNFs 16W



Fig. 12 400CNFs 16W

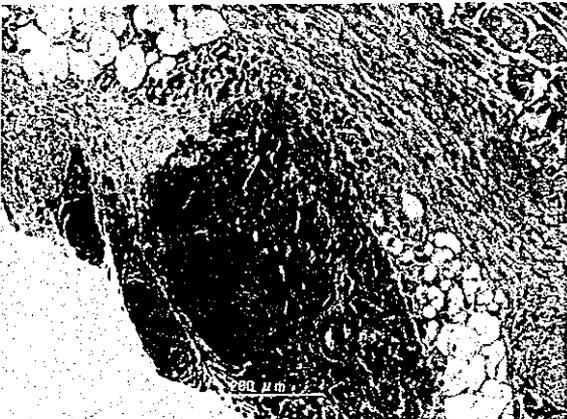


Fig. 13 1200CNFs 1W

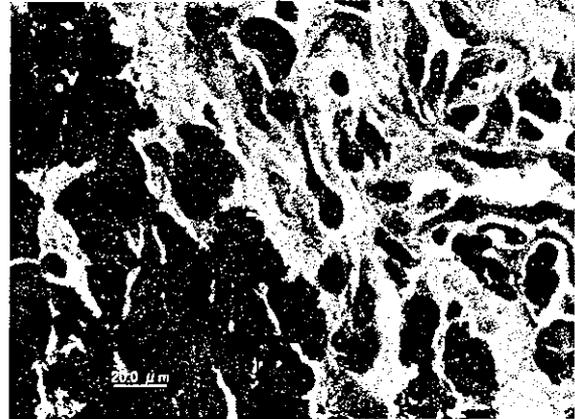


Fig. 14 1200CNFs 1W



Fig. 15 1200CNFs 16W



Fig. 16 1200CNFs 16W

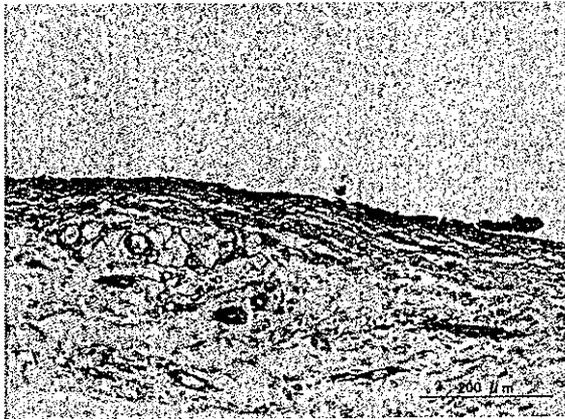


Fig. 17 SWCNTs 固化体 1W

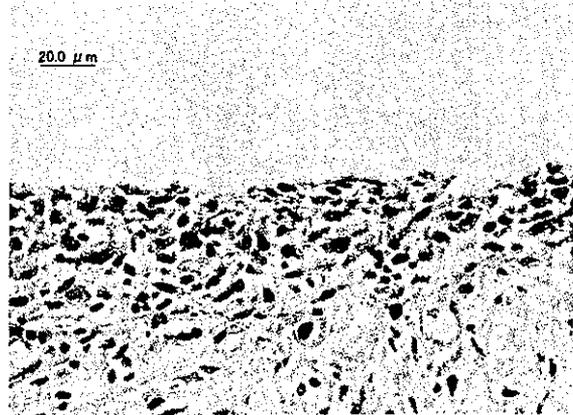


Fig. 18 SWCNTs/Phenol 固化体 1W



Fig. 19 グラファイト板 1W

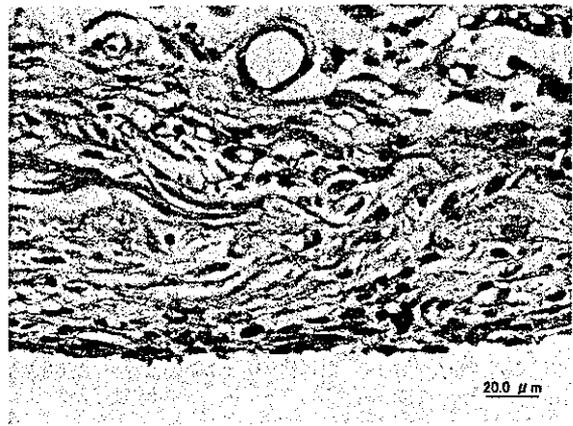


Fig. 20 MWCNTs/PCS25% 固化体 1W

蛍光 XAFS による

歯科用金属インプラント周辺組織における金属種の構造解析

○朝倉 清高

北海道大学触媒化学研究センター

宇尾 基弘・赤坂 司・亘理 文夫

北海道大学大学院歯学研究科生体理工学講座

横山 敦郎

北海道大学大学病院歯科診療センター

田村 一央・戸塚靖則

北海道大学大学院歯学研究科口腔外科第2講座

1. 序

XAFS (X線吸収微細構造) は、X線の内殻励起に伴い、放出される光電子が周辺原子より、散乱されることにより生じる吸収端より高エネルギー側の微細構造である。この XAFS 法は周辺原子の配置や吸収原子の電子状態といった吸収原子周辺の局所構造を与えることができる。また、透過力の強い X線を用いるため、物質内部に存在する吸収原子の局所構造を決定することができる。さらに、蛍光 XAFS 法を用いることで、ppm オーダしか存在しない微量物質の分析も行うことができる。

Ti は生体親和性、特に骨との結合性がよく、アレルギー反応が小さい元素であることから歯科用ならびに医療用インプラント材料として広く使われている。さて、チタンインプラント周辺組織に、黒化した部位がみられることがある。この原因として、摩耗粉、溶け出したチタンと組織が反応をおこしたものが考えられるが、生体組織に存在する Ti の量はきわめて少ないため、状態分析が困難であった。そこで、本研究では、蛍光 XAFS 法により、組織内に存在する Ti の周辺構造を調べた。もしこれが、タンパクと結びついた Ti あるいは、Ti により組織が変化したものであると、Ti に対する安全性に再検討を要することになる。

2. 実験

チタンインプラント2次手術の際に患者2名より除去された口腔粘膜組織を凍結乾燥して、試料とした。あらかじめ XSAM (X線分析顕微鏡 堀場製) にて、Ti の分布状況を確認し、XAFS の測定を行った。XAFS は高エネルギー加速器研究機構物質構造研究所放射光実験施設 BL9A で行った。分光結晶として Si(111)2 結晶モノクロメータを用いた。また2枚の円錐台ミラーによりサンプル表面に X線を集光した。X線のサイズは 1mm x 1mm である。蛍光 X線の検出は、19 素子半導体検出器を用いて行った。

3. 結果

図1に 試料 A の蛍光 XAFS の結果を示す。XSAM の結果によると、Ti 数十~数百ミクロンの大きさの粒状に固まりとして存在することが観測された。XAFS の結果、吸収端は Ti foil のそれとほぼ同じ位置に表れ、0 価に近い酸化数であることがわかる。また、微細構造も Ti foil のそれとよく一致し、Ti は金属微粒子状態で存在すると結論される。こうした微粒子状の金属は、Ti インプラント時に生じた摩耗粉であると考えられ、安定にインプラント周辺組織に存在する。

一方、試料 B では、XSAM を測定すると、比較的に一様の濃度をもつ Ti が局在して存在する。XAFS

を測定すると、図2に示す結果を得た。この吸収端付近のスペクトルは、アナターゼ型 TiO_2 の吸収スペクトルと一致しており、アナターゼ構造で存在すると考えられる。ビームを $100\ \mu\text{m}$ までしぼり左右に $200\ \mu\text{m}$ 動かして、測定した結果(図2の B,C,D)も併せて示すが、どの場所をとってもアナターゼ型の TiO_2 構造であることがわかる。インプラント近傍組織に Ti がアナターゼとして移行した原因については、さらに詳細の検討が必要であるが、Ti イオンが検出されないことから、たとえ、Ti が組織に移行したとしても Ti イオンとしてではなく、酸化物という安定な状態で存在するため、インプラント近傍に局在し、悪影響を与えないものと考えられる。

このように、今回の測定では、Ti は安定な Ti 金属微粒子あるいは、アナターゼ型 TiO_2 として存在することがわかり、Ti の歯科材料として適していることが裏付けられた。

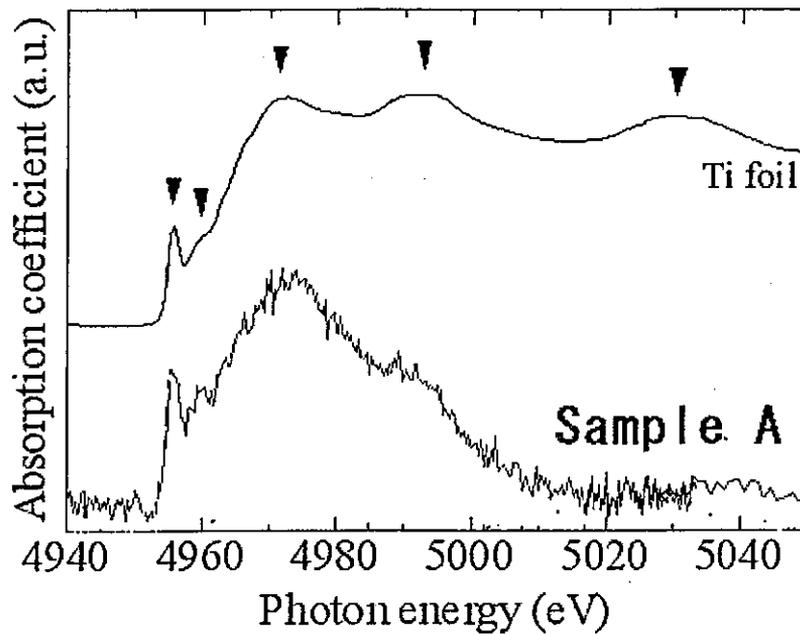


図1 Sample A の XANES 参考に Ti foil も掲げた。

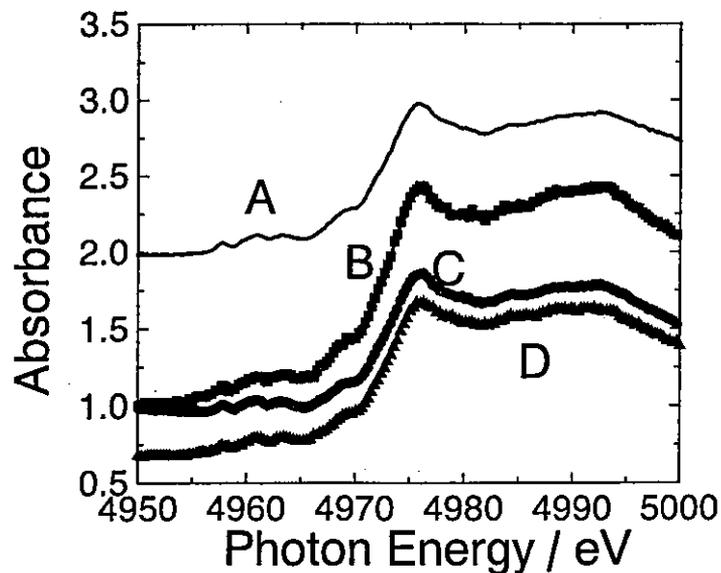


図2 Sample B の XANES A は $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 領域、B,C,D は $0.1\text{mm} \times 0.1\text{mm}$ に絞り、中央および左右に 0.2mm 離れた領域を測定したもの。

カーボンナノファイバーを用いた遺伝子導入法の開発と応用

北海道大学大学院歯学研究科・理学研究科・富士レビオ先端研究部

進藤 正信、古月 文志、柴 肇一

【背景】カーボンナノファイバーは、素材がカーボンであるため組織・細胞への為害作用はほとんどないものと考えられ、我々の研究グループは、カーボンナノファイバーを用いた遺伝子治療の可能性について検討してきた。

【方法と結果】

1. カーボンナノファイバーへの核酸の結合

カーボンナノファイバーに β -Gal 発現プラスミドを結合した。このカーボンナノファイバーを鋳型として、5'-actatcccgaccgccttact-3'の sense primer と 5'-tagcggctgatgttgaactg -3' antisense primer を用いた PCR によりカーボンナノファイバーとプラスミドの結合を検討したところ、 β -Gal 発現プラスミドに特異的な遺伝子配列の増幅が認められ、カーボンナノファイバーとプラスミドは結合しているものと考えられた。

2. 細胞への遺伝子導入

このカーボンナノファイバー/ β -Gal 発現プラスミド複合体をリポフェクション法により、ヒト肺癌由来細胞株 H1299 に遺伝子導入を試みた。その結果、長径 200nm のカーボンナノファイバーを用いたもので β -Gal の発現が確認され、遺伝子導入の tool としての可能性が示された。

3. カーボンナノファイバーを用いた遺伝子治療の試み

アポトーシスは細胞死の一型で、壊死/necrosis が受動的な細胞死であるのに対して、生理的あるいは病的な刺激により生じる自発的細胞死で、現在、Death receptor pathway と stress pathway の2つの経路に大別され、この過程に関与する遺伝子/遺伝子産物の相互作用が明らかになってきている。我々は、これまでウイルスベクターを用いてがん細胞に特異的にアポトーシスを誘導する遺伝子治療を試みてきた。しかし、ウイルスベクターは生体への為害作用が全くないとは言い切れないこと、ある種のウイルスベクターに対しては生体が抗体を産生するため継続した投与ができないことなどの問題点があった。現在、カーボンナノファイバーにがん細胞に特異的に発現するレセプターへのリガンドとアポトーシス誘導遺伝子を結合させ、遺伝子治療への応用を試みている。

環境メディシン応用の観点から見た CNT の魅力

Caged Multi-Walled Carbon Nanotubes as the Adsorbents for Affinity-Based Elimination of Ionic Dyes

Bunshi Fugetsu¹, Shuya Satoh¹, Toshikazu Shiba^{2, a, b}, Taeko Mizutani², Yong-Bo Lin¹, Norifumi Terui¹, Yoshinobu Nodasaka³, Katsushi Sasa⁴, Kiyoko Shimizu⁵, Tsukasa Akasaka³, Masanobu Shindoh³, Ken-ichiro Shibata³, Atsuro Yokoyama³, Masanobu Mori⁶, Kazuhiko Tanaka⁶, Yoshinori Sato⁷, Kazuyuki Tohji⁷, Shunitz Tanaka¹, Norio Nishi¹, and Fumio Watari³

¹ Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan; ² Frontier Research Division, FUJIREBIO Inc., 51 Komiya, Hachioji, Tokyo 192-0031, Japan; ^a Regenitiss Co., Ltd., 1-5-17, Okaya, Akabane, Nagano 394-0002, Japan; ^b Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Matsumoto, Japan; ³ Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-8586, Japan; ⁴ Otsuka Electronic Co., Ltd., 1-6 Azuma-cho, Hachioji, Tokyo, Japan; ⁵ Hokudo Co., Ltd., Bioscience Division, Abuta-cho, Abuta-gun, Hokkaido 049-5613, Japan; ⁶ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology at Seto, 110 Nishiibara-cho, Seto 489-0884, Japan; ⁷ Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, Sendai 980-8579, Japan.

Abstract

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) were used as the active elements for the first time for affinity-based elimination of ionic dyes. MWCNTs were encapsulated in cross-linked alginate micro-vesicles using Ba²⁺ as the bridging ions. The Ba²⁺-alginate matrix constitutes a polymer “cage”, which holds the physically trapped MWCNTs. Dyes partition into the vesicles and being then captured by MWCNTs based on affinity-based adsorption. The adsorptive capacities for acridine orange, ethidium bromide, eosin bluish, and orange G (the model species used for this study) were found as high as 0.44, 0.43, 0.33, and 0.31 micro-moles for 1.0 mg of the caged MWCNTs. The caged-MWCNTs showed no affinity towards humic acids (HAs). In other words, the Ba²⁺-alginate cage have the ability to prevent MWCNTs from being damaged by adsorbing hydrophobic compounds of large molecular weights. Adsorptive experiments with carbon nanofibers (CNFs) and activated carbons as the adsorbents were also performed. The MWCNT-based adsorbents provided the best capability for the affinity-based elimination of the targeted species. Biocompatibility experiments performed *in vitro* and *in vivo* provided promising results, suggesting potential applications of the caged-MWCNTs in *in-situ* environmental remediation.