

図27 二重カプセルの構造概略図

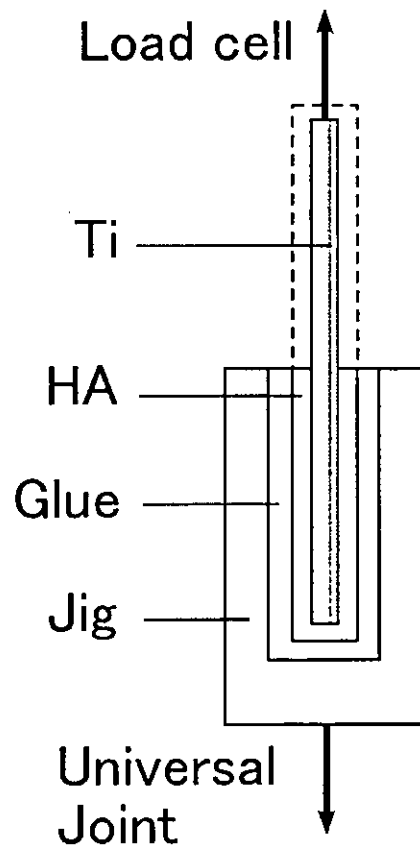


図28 引抜試験片の概略図

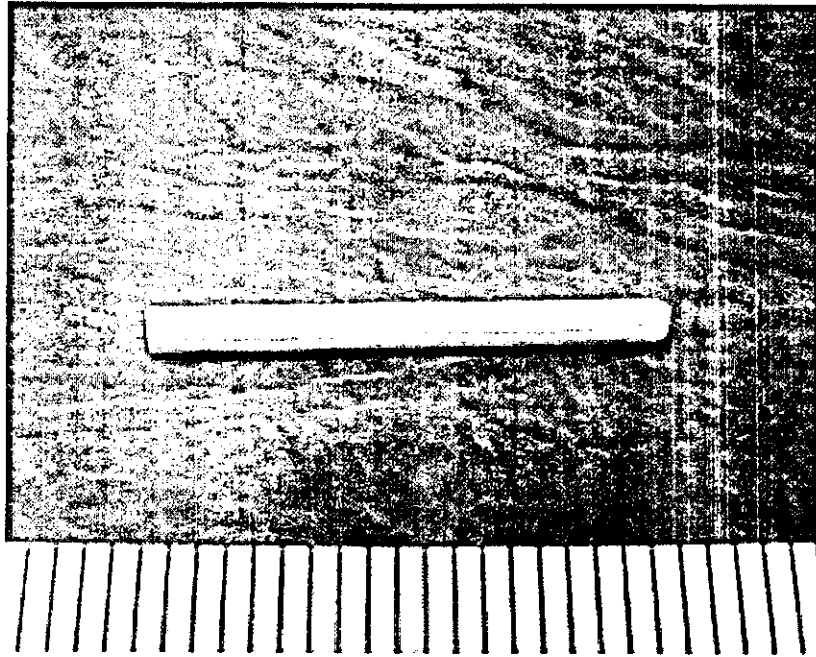


図29 カプセルから取り出したHAコーティング試料  
(直径1.5×20mm, 膜厚さ約50 $\mu$ m)

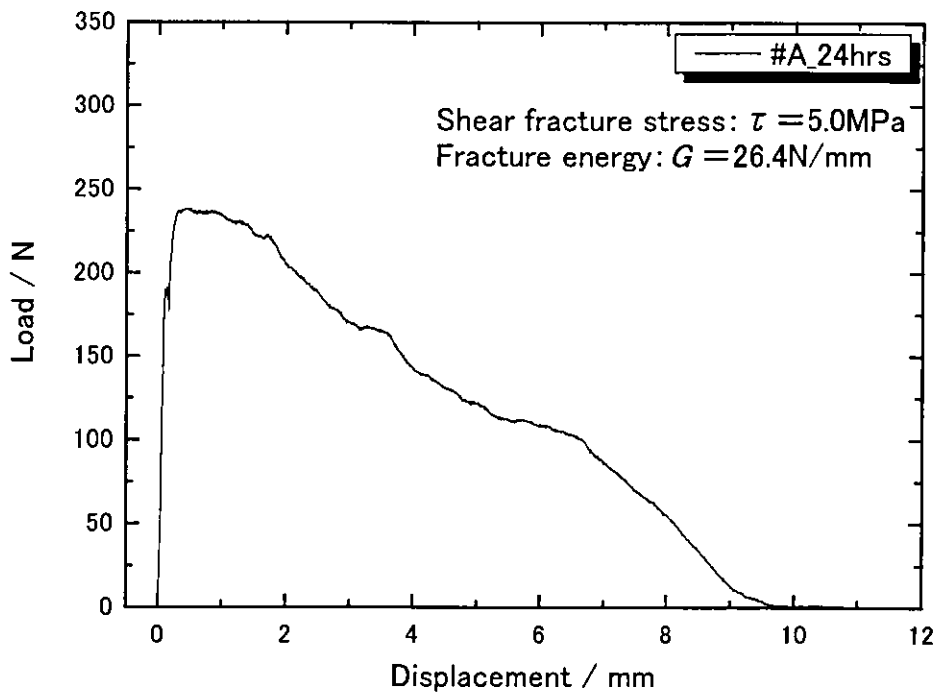


図30荷重-変位曲線の例 (表面処理A, 40 MPa, 135 $^{\circ}$ C,  
24hours)

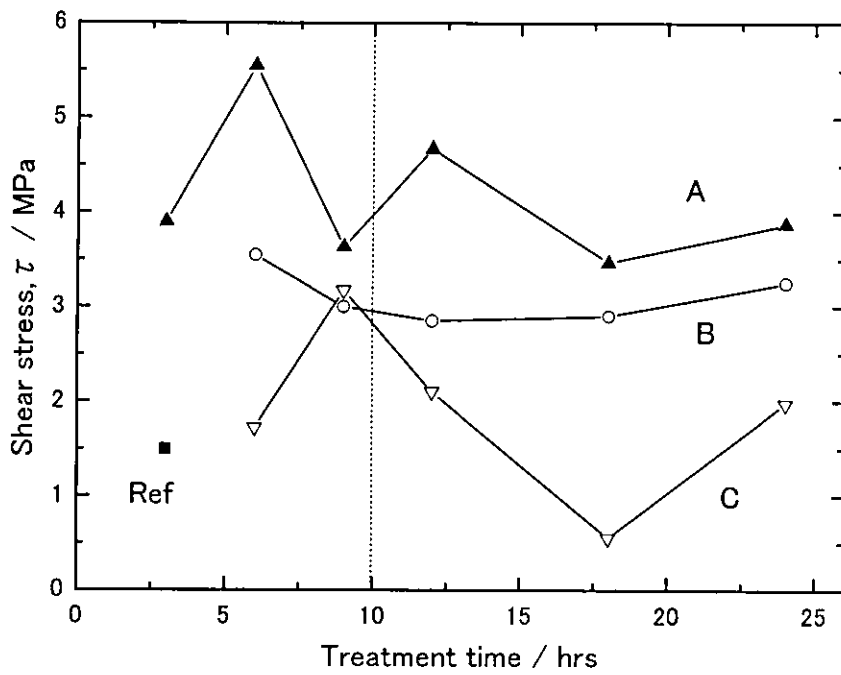


図31 それぞれのTi表面処理材のせん断強度とオートクレーブ処理時間の関係

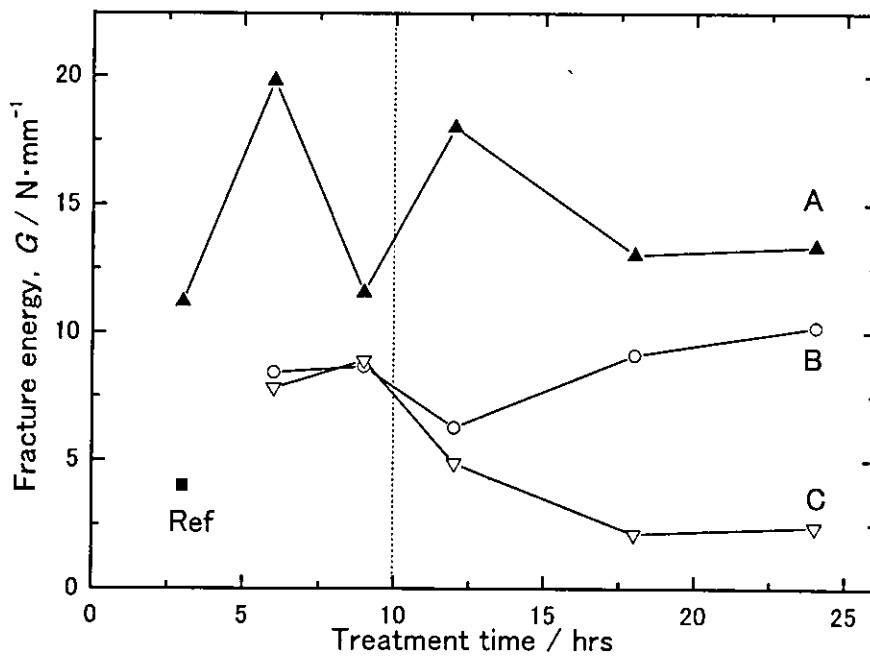


図32 それぞれのTi表面処理材の界面破壊エネルギーとオートクレーブ処理時間の関係

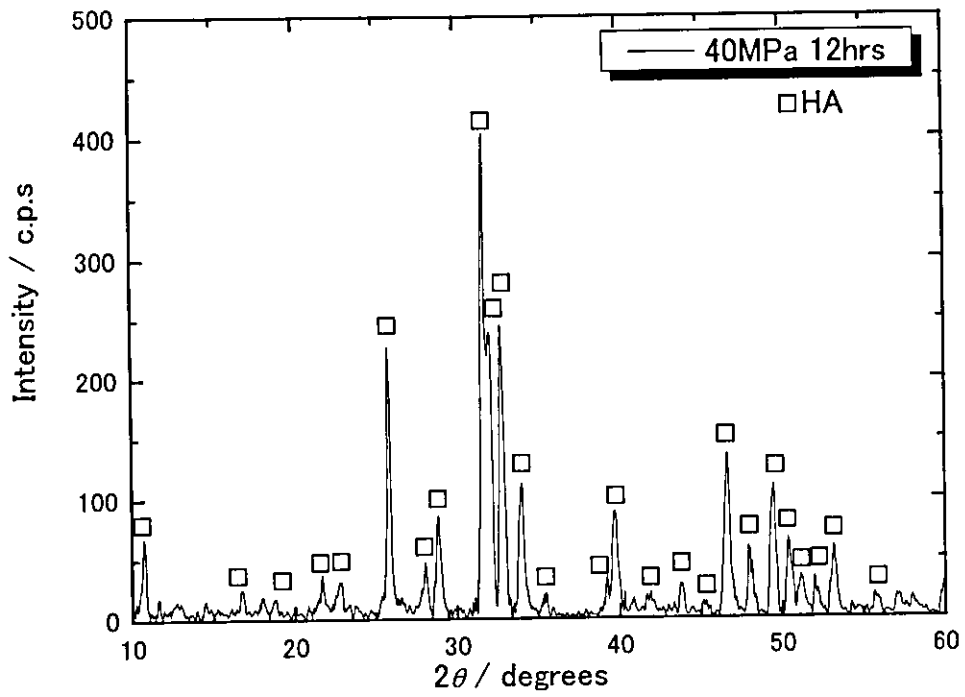


図33 HAコーティングのXRDパターン (40 MPa, 135 °C, 12 hours)



図34 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)

表4 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	$\tau$ (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

ナノ物質の生体材料への応用に関する研究  
*in vivo* および *in vitro* でのナノ物質の反応

研究代表者	川崎貴生	北海道大学歯学研究科教授
研究代表者	横山敦郎	北海道大学病院講師
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	北海道大学歯学研究科助手
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	衣斐美歩	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 我々の最終的な目的は、カーボンナノ物質を始めとするナノ物質の生体材料への応用である。しかし、ナノ物質の生体に対する毒性の解明は未だ不十分である。今回の研究においては、カーボンナノチューブおよびカーボンナノファイバーなどのカーボンナノ物質に対する *in vivo* および *in vitro* での反応を検索することを目的に研究を行った。材料として、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、それぞれの粉体およびSPSにて焼結した固化体をラットの皮下組織および大腿骨内に埋入後、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて観察した。また、*in vitro* においてはカーボンナノチューブを濾過膜に吸着させることにより細胞培養用スキャホールドを作製し、骨芽細胞様細胞を培養した。*in vivo* において、いずれのカーボンナノ物質も変性や壊死などの強い炎症反応は生じず、マクロファージ等に貪食された。*in vitro* においては、作製したスキャホールド上での骨芽細胞様細胞の増殖は、コントロールである濾過膜より速く、形態も広く伸展していた。以上の結果から、カーボンナノ物質の生体適合性および生体材料への応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

超高齢化社会が到来しつつある現在、医療費は増大し、国家財政の大きな問題の一つと的に

なっている。効果的に医療費を投下するためには、治療効果の高い治療法が開発されることが前提となる。このため、様々な分野において新しい治療方法を開発する努力が為されている。

再生医療、遺伝子治療などは、正しくこの努力の結果であり、疾病を有する多くの患者に福音をもたらすとともに、治療効果を高めることにより医療費の抑制に有効であり、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。新しい治療の開発に対して生体材料に関する研究は必須であり、さらに派生的に新たな産業を興す可能性も秘めている。

このような社会的背景をもとに、我々は工業界で新素材として注目されている、一昨年よりカーボンナノチューブに代表されるナノ物質に注目した。

我々の最終的な目標は、ナノ物質の Drug Delivery System (DDS)のキャリアや再生医療における細胞のスキャホールドへの応用である。しかし、これらナノ物質の医学領域への応用に際して、ナノ物質の毒性やこれらの物質に対する生体の反応についての基礎的な研究は少なく、未だナノ物質に対する生体の反応には不明な点が多い。本研究においては、*in vivo* および *in vitro* でのナノ物質の生体反応を詳細に検索することを目的に、カーボンナノ物質の一種であるカーボンナノファイバーとカーボンナノチューブを皮下組織および骨組織に埋入し、組織学的、超微細構造学的に検察するとともに、*in vitro* において、カーボンナノチューブ上で骨芽細胞様細胞を培養し、増殖および形態を検索した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### 1) *in vivo* 実験材料

##### (1) ハット積層型カーボンナノファイバー

(Hat-Stacked Carbon Nanofibers:H-CNFs)化学蒸着法により合成し、酸処理にて触媒金属である Ni を除去し、H-CNFs を得た。

さらに、長さを制御するため、H-CNFs を 95% 硫酸と 60%硝酸を 3:1 で混合した溶液中で 4 時間超音波処理を行い、洗浄、濾過後、さらにエタノール中で 1 時間超音波処理を行い、直径 2, 1.2 および 0.4 ミクロンの濾過膜で順に濾過し、平均長さ 590nm と 1160nm の H-CNFs を得た(以下 600H-CNFs および 1200H-CNFs とする)。

#### (2) 多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)

MWCNTs として Nano Lab 社製の MWCNTs を用いた。

さらに、触媒を除去するため、塩酸および水酸化ナトリウムで洗浄後、95%硫酸と 60%硝酸を 3:1 で混合した溶液中で 5 時間超音波処理を行い、MWCNTs を精製した。得られた MWCNTs の長さを制御するため、エタノール中で 1 時間超音波処理し、ポリカーボネート製の直径 2.0, 1.2, 0.8 および 0.4 ミクロンの濾過膜で濾過し、平均長さ 225nm および 825nm の MWCNTs を得た(以下 220MWCNTs および 825MWCNTs とする)。

#### (3) 多層カーボンナノチューブ固化体

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 CNT 固化体

直径 20-50nm, 長さ 5 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C の条件で SPS 装置にて焼結し、1 $\times$ 1 $\times$ 5mm に調整した。

②polycarbosilane 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 $^{\circ}$ C の条件で SPS 装置にて焼結した。

③CNT-HAp : CNT を放電プラズマ焼結法 (SPS 法) を用いて、120MPa, 120 $^{\circ}$ C, 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。

## 2) *in vitro* 実験材料

Nano Lab 社製、直径 20-40nm、長さ 5-20 ミクロンの多層カーボンナノチューブ (MWCNTs) を用いた。SWCNTs は、東北大田路研で触媒として Fe-Ni を用いて作製した直径 1.3-1.5nm、長さ 2-3 ミクロンのものを使用した。

## 2. 方法

### 1) 動物埋入実験

#### (1) CNTs および CNFs 粉体

6 週齢雄性ウイスター系ラットを、実験動物として用いた。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、試料を埋入し、1、4 および 16 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た。摘出した組織を、浸漬固定後 2 分割し、一方は、パラフィンに包埋し、5 ミクロンの厚さで薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡で観察した。もう一方は、Epon812 に包埋し、厚さ約 80nm で薄切し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛にて二重染色後、電子顕微鏡で観察した。

#### (2) MWCNTs 固化体

8 週齢雄性ウイスター系ラットを実験動物として用いて、粉体同様に腹部皮下組織内に埋入し、1 および 2 週後に摘出し光学顕微鏡で観察した。

#### (3) CNT-Hap 固化体

14 週齢雄性ウイスター系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。6 週後に摘出し、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

### (1) 細胞培養用スキャホールドの作製

直径 47mm、ポアサイズ 0.8 ミクロンのポリカーボネート膜 (PC 膜) とポリテトラフルオロエチレン膜 (PTFE 膜) を用いて、脱イオン水中で超音波処理をした MWCNTs および SWCNTs を吸引濾過し、PC および PTFE 膜に固定し、加熱乾燥し細胞培養用スキャホールドを作製した (以下 MWCNTs+PC, MWCNTs+PTFE, SWCNTs+PC, SWCNTs+PTFE とする)。

### (2) 骨芽細胞様細胞の培養

作製した培養用スキャホールドを 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  $1.5 \times 10^6$  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°C、5% CO<sub>2</sub> の気相下で培養した。培養 3 日後および 7 日後の細胞数を SEM 写真上にて測定した。

### (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) H-CNFs について

##### (1) 長さ未制御 H-CNFs 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。CNFs 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、CNFs の小さな粒子が観察された (Figure 1, 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 CNFs 粒子が観察された(Figure 3). CNFs の粒子の多くは、膜に覆われており、ライソゾ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(Figure 4).

4 週後、基質化は進み、CNFs 粒子の集塊は菲薄な線維性結合組織に被包されていた。CNFs 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(Figure 5, 6). TEM による観察において、1 週後に比較し CNFs 粒子の凝集の程度は弱くなり分散する傾向を示した (Figure 7). CNFs を取り囲むライソゾームの膜は、1 週後に比較しほとんど観察されなかった (Figure 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 (Figure 9).

(2)600H-CNFs : 埋入 1 週後においては、大きな塊の H-CNFs は、線維性結合組織に被包されていたが、多くの H-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、炎症は軽微であった(Figure 10, 11). TEM 観察においては、多くの H-CNFs は、細胞質内で円形に集合しており、ライソゾーム内にも H-CNFs が観察された(Figure 12, 13). 16 週後では、H-CNFs を貪食したマクロファージの集積が観察されたが、線維性結合組織の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 (Figure 14,15). TEM 観察においては、ほとんどの H-CNFs は、ライソゾーム中に認められた。ライソゾーム中の H-CNFs は、長さが短くなっているものやその特有の構造が壊れているものも認められた(Figure 16, 17, 18).

(3)1200H-CNFs : 1 週後においては、600H-CNFs

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ものが多数認められたが、貪食されていないものが 600H-CNFs に比較し多く観察された(Figure.19,20). 炎症は軽微であるが、600H-CNFs に比較しやや強い傾向を示した。TEM 観察では、細胞質内に 1200-CNFs が多数観察されたが、ライソゾーム内には認められなかった(Figure 21, 22). 16 週後においては、600H-CNFs 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 1200H-CNFs が観察された(Figure 23,24). TEM 観察では、細胞質内に円形に集合している 1200H-CNFs が多数認められ、一部のものはライソゾーム内に存在し、600H-CNFs と同様に、短縮や結晶構造の変化が観察された(Figure 25, 26, 27).

## 2) MWCNTs について

### (1) 未精製 Nano Lab MWCNTs について

1 週後、CNTs 塊は肉芽組織に被包されており、CNTs 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 (Figure 28, 29). 4 週後では、CNTs 塊は線維性結合組織に被包されていたが、CNTs 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(Figure 30, 31). TEM 観察では、CNTs 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 CNTs 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(Figure 32, 33). 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(Figure 34).

### (2)220MWCNTs :

埋入 1 週後においては、220MWCNTs の多くは、マクロファージや線維芽細胞内に観察され、

大きな集塊周囲には異物巨細胞が観察された (Figure 35, 36) が、強い炎症反応は観察されなかった。TEM 観察において、220MWCNTs の多くは、マクロファージ中のライソゾーム内に観察された。220MWCNTs は凝集していたが、特有なチューブ状の形態には変化は認められなかった (Figure 37, 38)。

16週においては、220MWCNTs はマクロファージやコラーゲン線維間の線維芽細胞中に観察された。比較的大きな集塊の周囲には異物巨細胞が観察されたが、炎症反応は認められなかった (Figure 39, 40)。TEM 観察においては、1, 4週同様に CNT は、マクロファージや線維芽細胞内のライソゾーム中に観察された。その多くは凝集しており、チューブ状の形態に変化は認められなかった (Figure 41)。また、コラーゲン線維間に凝集した CNT の集塊が観察された (Figure 42)。

#### (2) 825MWCNTs について

埋入1週後、825MWCNTs 周囲には軽度な炎症反応を伴う肉芽組織が観察された。220MWCNTs に比較すると炎症反応はやや強い傾向を示した (Figure 43)。825MWCNTs の一部は、マクロファージに貪食されていた (Figure 44)。TEM では、細胞間の一部に 825MWCNTs が観察されたが (Figure 45)、マクロファージの細胞質内に凝集した CNT が認められ、膜構造で覆われていないものが多かった (Figure 46)。

埋入16週後では、ほとんどの 825MWCNTs は、マクロファージや線維芽細胞内に観察されたが (Figure 47)、一部の 825MWCNTs 周囲に異物巨細胞が多数認められ、肉芽腫性炎を呈していた (Figure 48)。TEM においては、ライソゾームに存在する 825MWCNTs が多く認められるようになったが、その構造に変化は観察されなかった (Figure 49, 50)。

### 3) MWCNTs 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 (Figure 51)。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 (Figure 52)。

#### ② polycarbosilane 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 (Figure 53, 54)。CNTs 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 (Figure 55, 56)。

#### (2) CNT-HAp について

CNT-HAp は、骨髓腔の中央に認められた (Figure 57)。HAp 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 (Figure 58)。

### 2 in vitro 試験

吸引濾過により、MWCNTs, SWCNTs とも

PTFE 膜および PC 膜に固着することが可能であり、細胞培養液中でも剥離することはなかった。Figure59-62 に MWCNTs および SWCNTs を固着した濾過膜を示す。CNTs は、むらなくほぼ均一膜上に観察された。SWCNTs は、MWCNTs に比較し、太いバンドルを形成していることが示された。Figure63-68 に、培養7日後の SEM 像を示す。基盤として PTFE および PC のいずれを用いた場合でも、CNTs を固着させたほうが、細胞数は多く、また SWCNTs のほうが、MWCNTs より細胞数は多い傾向を示した。Figure 69 に、3日および7日後の細胞数を示す。経時的に細胞数は増加しているが、特に SWCNTs においては、MWCNTs に比較し著しく増加していることが示された。CNTs を固着させる基盤の影響は、3日後では明確ではなかったが、7日後では PC のほうが PTFE より細胞数は多く、特に MWCNTs において顕著であった。

細胞の形態は、CNTs 上で培養した細胞は、平坦で広く伸展しているものが多く (Figure 70, 71)、細胞の突起は CNTs に密に接触していた (Figure 72)。また、トリプシン処理を行っても、細胞は丸くなるものの基盤から剥離せず、細胞の突起が CNTs 間に入り込んでいることが示された (Figure 73)。

## D. 考察

### 1) *in vivo* 埋入試験の結果について

#### (1) H-CNFs について

長さが制御されていない CNFs について埋入試験を行い、次いで長さを2種類に制御した CNFs について長さの影響を検索した。長さを制御していない CNFs のほうが、炎症の程度は強い傾向を示した。特に異物巨細胞の出現が多く、異物性炎を呈していた。しかし、

いずれの CNFs についても、観察した期間中、変性や壊死などの強い炎症反応は認められず、埋入初期に軽微な炎症が認められるにすぎなかった。長さが異なる2種の H-CNFs のうち、長い 1200H-CNFs の炎症反応のほうが、600H-CNFs に比較し強い傾向を示した。この原因として、1200H-CNFs のほうがマクロファージに貪食されにくいことが考えられる。これは、TEM 所見からも裏付けられる。600H-CNFs は、埋入1週においても、ライソゾーム中に認められるものがあり、また多くの H-CNFs が、細胞質内において円形に集合していた。このことは、マクロファージ内で CNFs の処理が1週においても進行していることを示すものと推察される。1200H-CNFs においても、16週後においては、ライソゾーム内に多数の H-CNFs が観察され、経時的にマクロファージ内で 1200H-CNFs の処理が進んでいることを示された。これには、凝集している H-CNFs の分散や H-CNFs の切断による短縮が関係するものと考えられる。ライソゾーム中に観察される H-CNFs は、いずれの長さの H-CNFs であっても、400nm 以下のものが多かった。短くなったものがライソゾームの中に入りやすいのか、あるいはライソゾーム内で H-CNFs が切断されるのかは明確ではないが、H-CNFs は、マクロファージ内で処理されることが示された。H-CNFs は、傘状のグラフェンシートが積層された形態をしており、1枚1枚のグラフェンシートはファンデルワールス力で結合しているため、切断には大きなエネルギーを要しない。またグラフェンシートのエッジには、水酸基があり、細胞内の酵素やタンパクと容易に結合することが可能であり、いわゆるデラミネーションが起こりやすいことも H-CNFs の切断に関係するものと考えられる。また、興味深い所見として、埋入16週でライ

ソゾーム内において一部に、H-CNFs の特有の構造である積層された傘状の構造に変化が認められた。これは、結晶の変化と考えられるが、詳細については今後さらなる研究が必要と考えられる。

また、H-CNFs が細胞内で切断されたことは、DDS のキャリアとしての可能性を示唆するものであり、今後生理活性物質と複合などの研究が望まれる。

## (2) CNTs について

まず、未精製の CNTs について埋入試験を行ったが、CNTs の凝集が強く、マクロファージや異物巨細胞が近接するものの貪食されているものはほとんど認められなかった。これは、純度が 80% と低く夾雑物の影響と考えられる。また、精製し長さが制御された CNTs に比較し、CNTs そのものの形態が明確ではなく、夾雑物との凝集などが原因と考えられた。

精製した CNTs については、H-CNFs と同様に、変性や壊死などの強い炎症反応は認められなかったが、起炎性は H-CNFs に比較するとわずかではあるが強い傾向を示した。また、異なる長さの MWCNTs を用いて反応を検索したが、H-CNFs 同様に長い 825MWCNTs のほうが起炎性が強く、埋入 16 週においても異物巨細胞が集積するいわゆる肉芽腫性炎が認められた。TEM 所見からも、220MWCNTs が 1 週間後からライソゾーム内に認められるのに対し、825MWCNTs では、細胞質内で凝集して存在しているものが多く、長い MWCNTs のほうが、マクロファージ内で処理されにくいことが示された。これは、長い MWCNTs の凝集性のほうが強いということに起因すると推察された。16 週においては、825MWCNTs においても一部にライソゾーム内に MWCNTs が観察されたが、凝集の程度は弱く、MWCNTs の構造が明確に

認められた。これらのことから、MWCNTs は細胞質、ライソゾーム内でタンパクや酵素の影響を受け凝集程度が弱くなったものと考えられた。また、H-CNFs と異なり、MWCNTs では、切断、短縮や結晶構造の変化は認められず、チューブ状の構造が埋入 16 週においても維持されていた。これは、H-CNFs が、積層したグラフェンシートがファンデルワールス力により結合しているのに対し、MWCNTs は炭素の六員環が連続している結晶構造をとるため、機械的強度が強だけでなく、化学的に安定であることも関係すると推察された。

これらのことから、同じカーボンナノ物質であっても、その構造により生体に対する反応および生体内での挙動が異なることが示された。

## (3) CNTs 固化体について

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。

#### (4) CNT-HAp について

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。

#### 2) *in vitro* 細胞培養試験の結果について

CNTs 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に比較し、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、CNTs のコーティングによる膜の表面構造の変化や CNTs への血清タンパクの吸着が考えられる。SEM 像において、CNTs 表面に顆粒状の物質が認められたことから CNTs 表面への培地中の物質の吸着の可能性が示唆された。特に、SWCNTs のほうが、MWCNTs より細胞の増殖が多いという結果は、CNTs へのタンパクの吸着を示唆するものである。SWCNTs は MWCNTs より化学的に不安定であり、太いバンドルを形成しやすいことが一般的に知られ

ており、本研究の SEM 所見からバンドルの形成が確認された。この化学的な不安定さが培地中の血清タンパクの吸着に影響するものと考えられた。CNTs へのタンパクの吸着は、現在に注目されている事象であり、ナノ物質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、通常細胞を基盤から剥離するために使用される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、CNTs が細胞の突起に緊密に嵌合していることを示しており、この事象は、CNTs と細胞の機械的な結合を示唆するものであり、細胞培養用のスキャホールドとしての可能性が示された。

#### E. 結論

カーボンナノ物質の *in vivo* および *in vitro* での毒性および生体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. ハット積層型カーボンナノファイバー (H-CNFs) および多層カーボンナノチューブ (MWCNTs) を皮下組織に埋入した場合、周囲組織に変性、壊死などの強い炎症反応は惹起しなかった。
2. H-CNFs, MWCNTs いずれも長いほうが、起炎性は強く、貪食されやすさ、処理されやすさが起炎性に関与することが明らかとなった。
3. H-CNFs はマクロファージに貪食された後、切断や結晶構造の変化が生じるが、MWCNTs は、このような変化が生じておらず、結晶構造が生体内での挙動に関与することが示唆された。
4. CNTs 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。

5. CNTs を吸着させた膜上で培養した場合、CNTs 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。特に、SWCNTs を固着させた場合増殖が多いことから、CNTs へのタンパクの吸着が示唆された。

6. 以上のことから、カーボンナノ物質の DDS や再生医療におけるスキャホールドなど生体材料としての可能性が示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) A.Yokoyama, S.Yamamoto, T.Kawasaki, T.Kohgo, M.Nakasu. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials *Biomaterials* 23. 1091-1101, 2002
- 2) Y.Tamura, A.Yokoyama, F.Watari, M.Uo, T.Kawasaki Mechanical properties of surface nitrided titanium for abrasion resistant implant materials *Materials Transactions* 43. 3043-3051, 2002
- 3) Y.Tamura, A.Yokoyama, F.Watari, T.Kawaski Surface properties and biocompatibility of nitrided titanium for abrasion resistant implant materials *Dental Materials Journal* 21.355-372, 2002
- 4) A.Yokoyama, H.Matsuno, S.Yamamoto, T.Kawasaki, T.Kohgo, M.Uo, F.Watari, M.Nakasu. Tissue response to a newly develop calcium phosphate cement containing succinic acid and CM-chitin *Journal of Biomedical Materials Research* 63. 491-501, 2003
- 5) R.Fujita, A.Yokoyama, T.Kawasaki, T.Kohgo.

Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate blocks. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1045-1053,2003

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

7) 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

8) 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.

9) 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. *北海道歯誌*. 25:330-338. 2004.

10) Watari,F., Yokoyama, A., Omori,M., Hirai,T., Kondo,H., Uo,M., Kawasaki,T. Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for bio-medical application. *Composites Science and Technology*.64:139-141,2004.

11) Kondo,H., Yokoyama,A., Omori,M., Ohkubo,A., Hirai,T., Watari,F., Uo,M.,Kawasaki,T. Fabrication of Titanium Nitride/Apatite Functionally Graded Implants by Spark Plasma Sintering. *Materials Transactions*.145:893-908,2004

12) Fugetsu,B., Satoh,S., Shiba,T., Mizutani,T., Lin,Y., Terui,N., Nodasaka,Y., Sasa,K.,Shimizu,K., Akasaka,T., Shindoh,M., Shibata,K., Yokoyama,A.,

Mori,M., Tanaka,K., Sato,Y., Tohji,K., Tanaka,S., Nishi,N., Watari,F. Caged Multi-Walled Carbon Nanotubes as the Adsorbents for Affinity-Based Elimination of Ionic Dyes Environmental Science & Technology. 38:3156-3162,2004.

13)Yokoyama,A.,Sato,Y.,Nodasaka,Y.,Yamamoto,S.,Kawasaki,T.,Shindoh,M.,Kohgo,T.,Akasaka,T.,Uo,M.,Tohji,K., Watari,F. Biologocal behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats Nano Letters. 5:157-161,2005.

## 2. 学会発表

1) 川崎貴生, 横山敦郎 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 *in vitro* 生化学的解析, *in vivo* 動物埋入実験, 臨床応用基礎開発 単体/集塊の動物埋入実験 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 14 年度第一回目標策定研究発表会抄録集 40-41, 2002

2) 田村豊 耐摩耗性を有する表面窒化チタンインプラントの特性と生体適合性 平成 14 年度北海道歯学会秋期学術大会 2002

3) 横山敦郎, 川崎貴生, 野田坂佳伸, 向後隆男, 古月文志, 大森守, 田路和幸 カーボンナノチューブ皮下埋入における周囲組織の反応 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 14 年度第二回研究発表会抄録集 28-31, 2003

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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

1 1) 青木尚史, 横山敦郎, 川崎貴生, 野田坂佳伸, 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—細胞培養用担体の開発—, 第 27 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 200,2004.

1 2) 佐藤義倫, B.ジャヤデワン, 田路和幸, 畑山力三, 田村一央, 赤坂司, 宇尾基弘, 横山敦郎, 柴田健一郎, 亘理文夫. 生体医学応用のための Hat-stacked-type カーボンファイバーの水溶化. 第 27 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 202,2004.

1 3) 横山敦郎, 山本悟, 王蔚, 青木尚史, 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, 山本剛, 大森守, 橋田俊之. 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-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 16 年度夏期第 5 回研究発表会抄録集, 2004

1 4) 赤坂司, 青木尚史, 横山敦郎, 柴田健一郎, 田村一央, 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. 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 16 年度夏期第 5 回研究発表会抄録集, 2004

1 5) 青木尚史, 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—その 2—3 日培養と 7 日培養の比較. 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

16 年度夏期第 5 回研究発表会抄録集, 2004

1 6) 衣斐美歩, 和田悟史, 張桂霞, 中島愛子, 飯田順一郎, 横山敦郎, 田村正人. 佐藤義倫, 田路和幸, 山本松男, 高尾尊身, 和泉雄一. サイズ制御したカーボンナノチューブならびにファイバーの歯根膜細胞における細胞増殖と機能に及ぼす影響. 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 16 年度夏期第 5 回研究発表会抄録集, 2004

1 7) 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, 亘理文夫, 大森守. カーボンナノチューブ固体化の焼結と生体適合性. 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 16 年度夏期第 5 回研究発表会抄録集, 2004

1 8) Yokoyama,A., Sato, Y., Nodasaka,Y., Yamamoto,S., Kawasaki,T., Shindoh,M., Kohgo,T., Akasaka,T., Uo,M., Watari,F., Tohji,K. Biological Behavior of Hat-Stacked-Type Carbon Nanofibers in the Subcutaneous Tissue in Rats. International Symposium of Tissue Response and Biomedical Application of Carbon Nanotubes, Nanofibers, and Nanoparticles. 2004.

1 9) 青木尚史, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 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 20.2005

2 0) 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. カーボンナノ物質の生体材料への応用—in vivo での反応に対するカーボンナノチューブの長さの影響—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 16 年度冬季第 6 回研究発表会抄録集, 2005



2 1) 青木尚史, 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—細胞培養用担体としての応用—その3—多層カーボンナノチューブと単層カーボンナノチューブとの比較 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 16 年度冬季第 6 回研究発表会抄録集, 2005

2 2) 衣斐美歩, 和田悟史, 佐藤義倫, 田路和幸, 山本松男, 張桂霞, 中島愛子, 和泉雄一, 高尾尊身, 飯田順一郎, 横山敦郎, 田村正人 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 16 年度冬季第 6 回研究発表会抄録集, 2005

2 3) 王蔚, 横山敦郎, 川崎貴生, Liao, S, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理文夫. 焼結したカーボンナノチューブ固化体の生体適合性ナノチューブ, 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 16 年度冬季第 6 回研究発表会抄録集, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



Figure 1

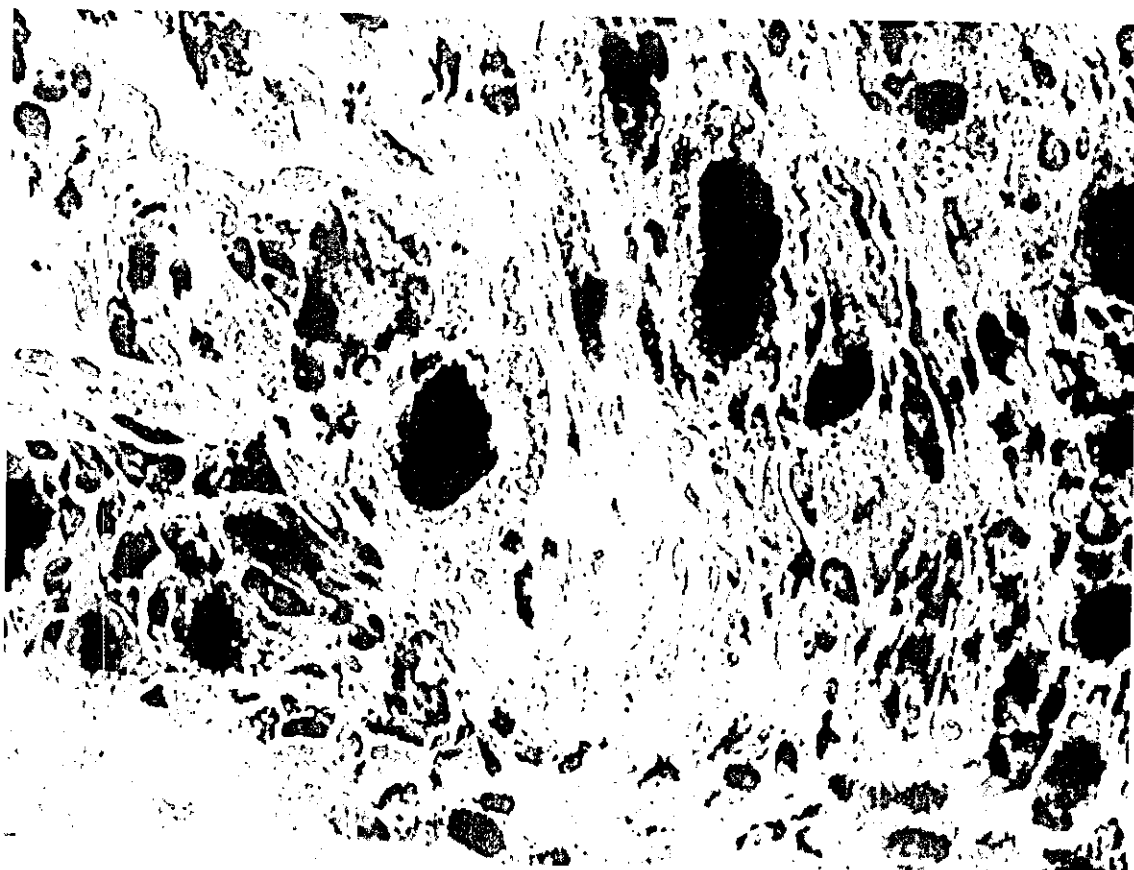


Figure 2

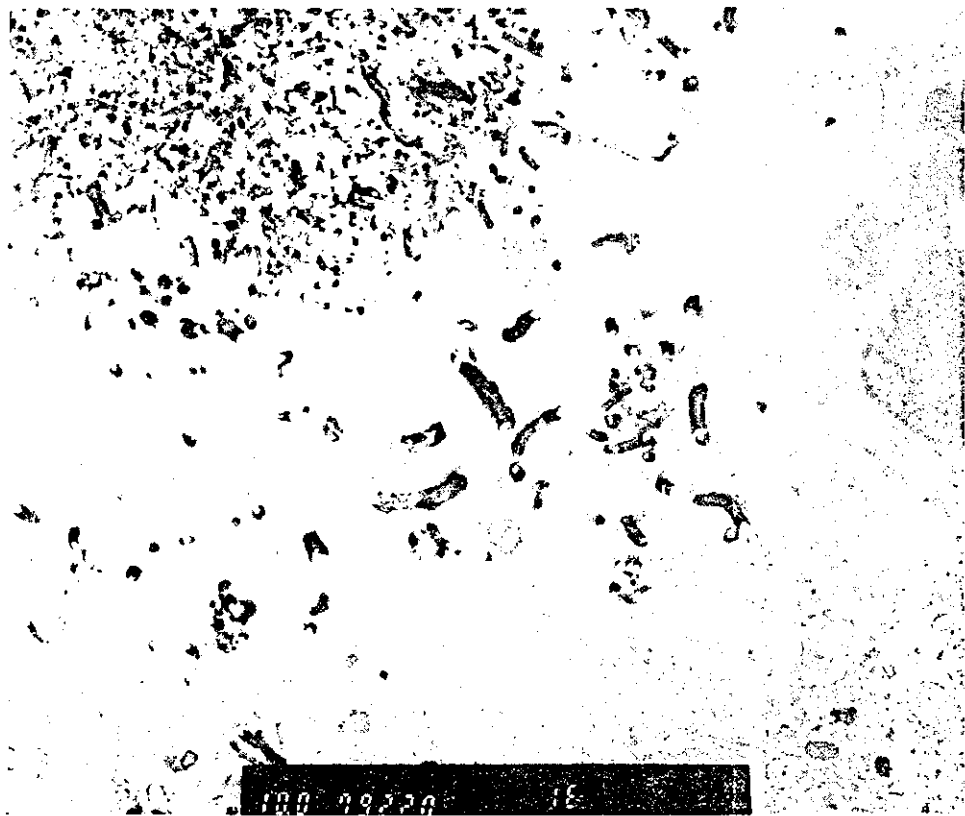


Figure 3

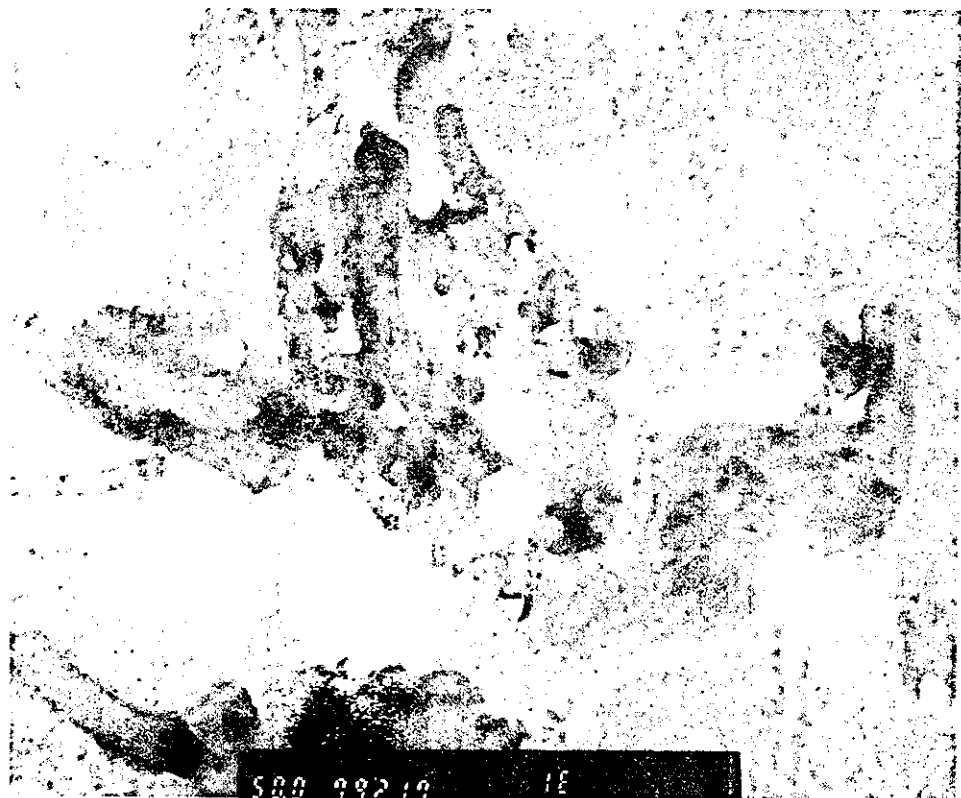


Figure 4

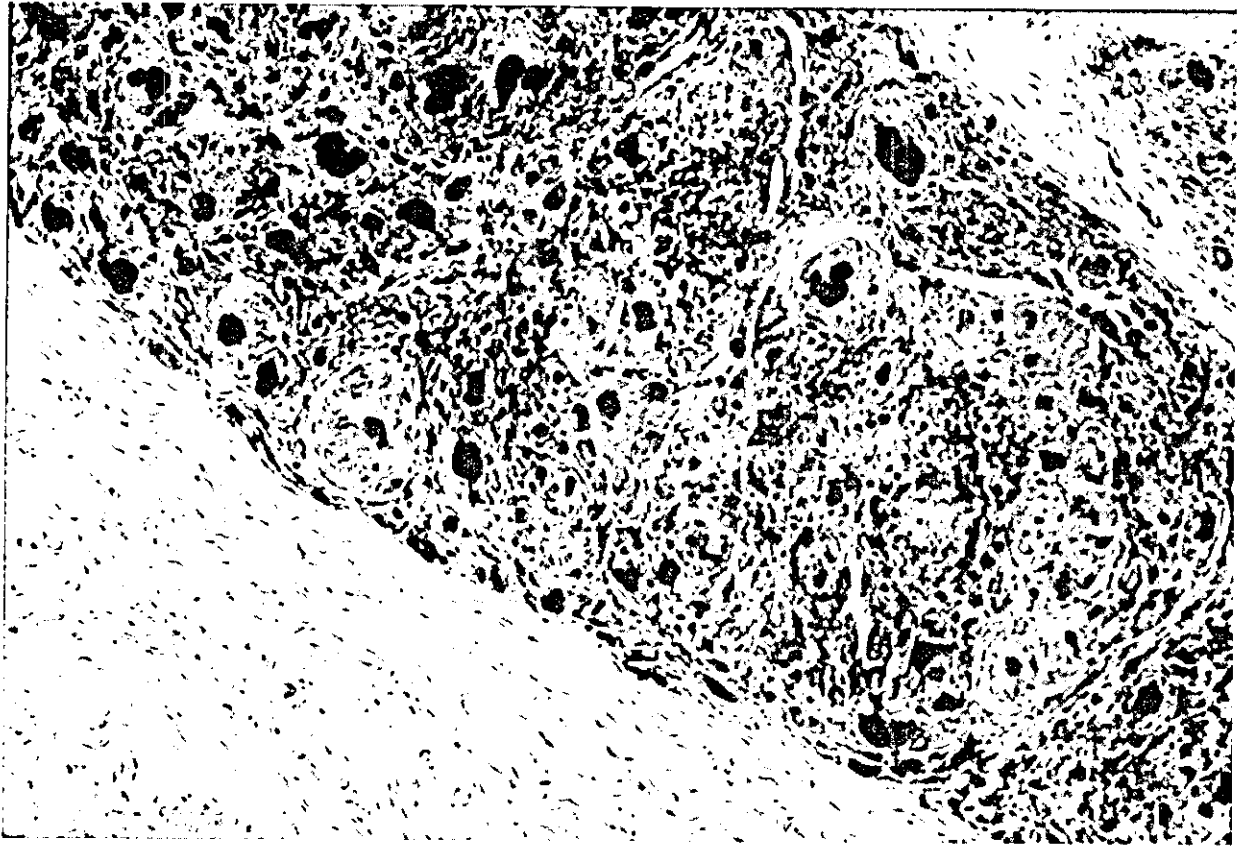


Figure 5

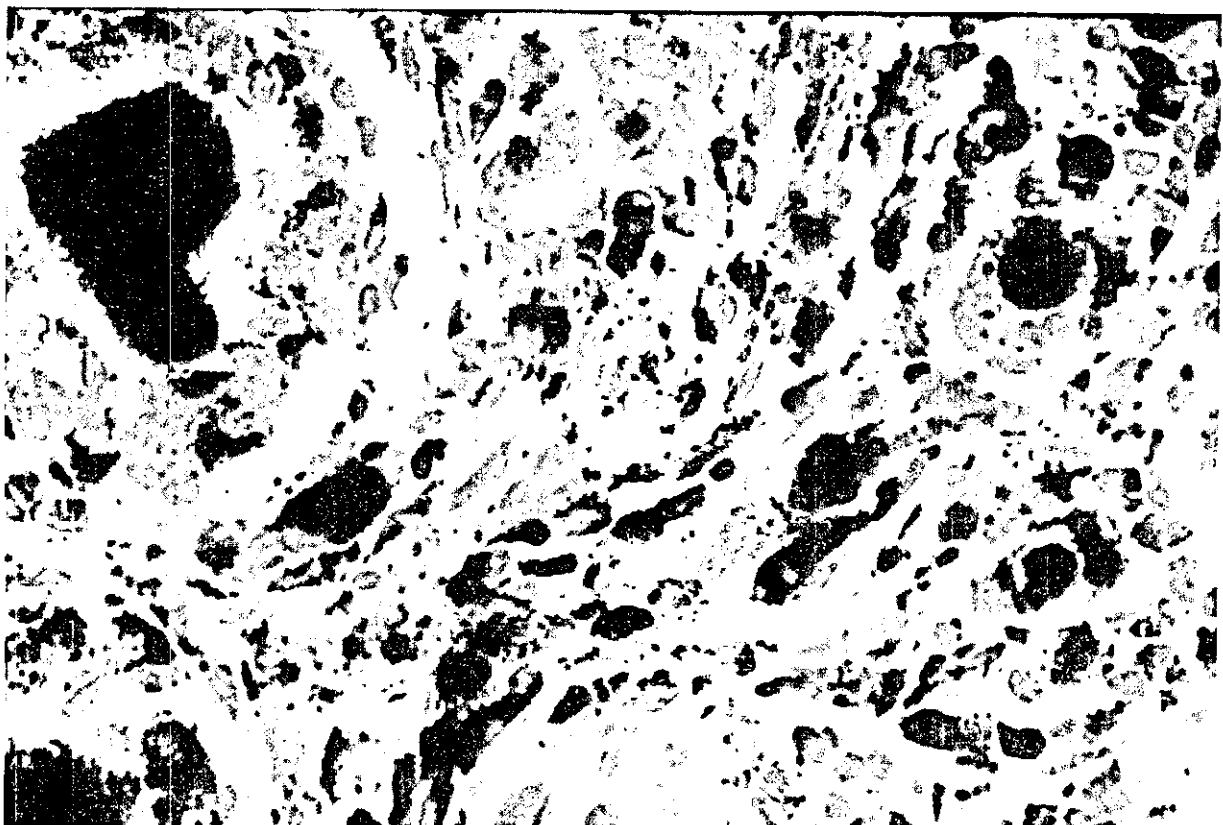


Figure 6