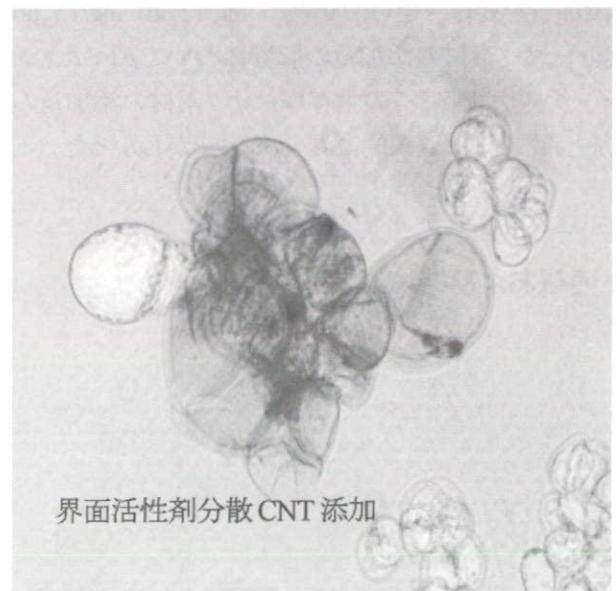
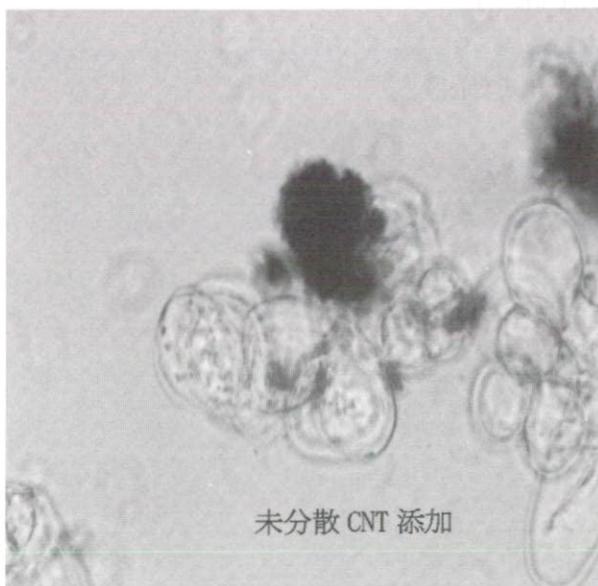


Table 1 MWCNTs and concentrations of the selected metal elements found in the samples extracted from the CNTs with 17% HCl aqueous solution.

MWCNTs	P-MWCNTs	U-MWCNTs	D-MWCNTs
Average diameter	9.5 nanometers		
Average Length	1.5 micrometers		
Carbon Purity	90%		
Specific Surface area	250-300 m ² /g		
Al	3.64%	3.3%	0.801%
Ni	0.011%	0.001%	0.009%

P-MWCNTs denote the primary MWCNTs, U-MWCNTs, the dispersed MWCNTs by ultrasonication, D-MWCNTs, the dispersed MWCNTs with surfactant as the dispersant.



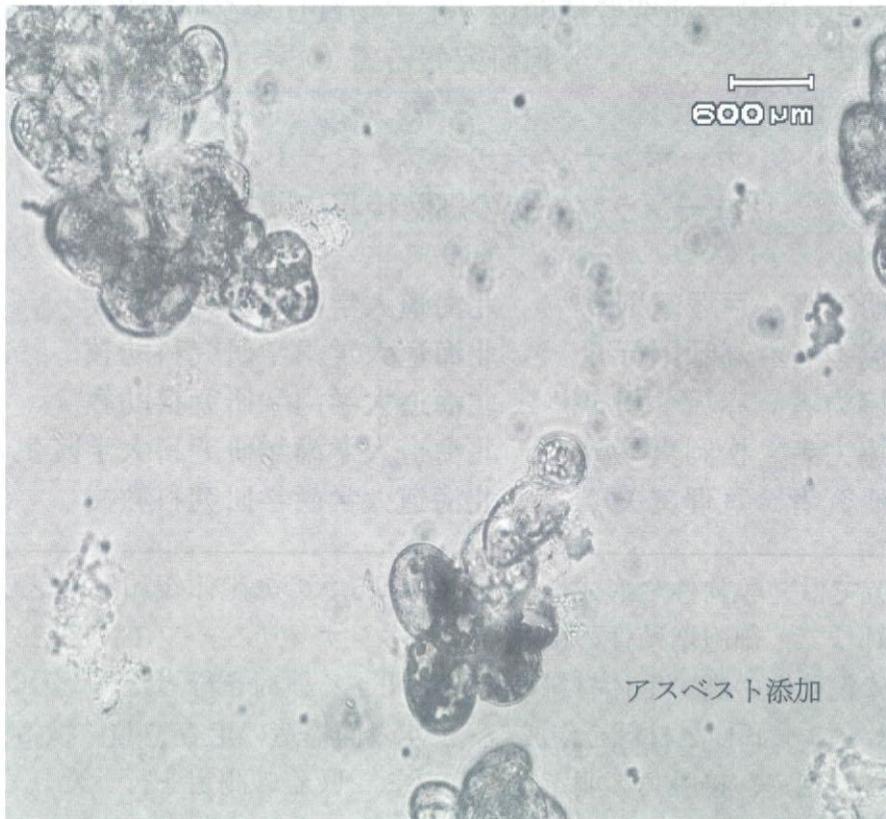


Figure 1 Observation of the suspension cultured T87 cells using light microscopy.

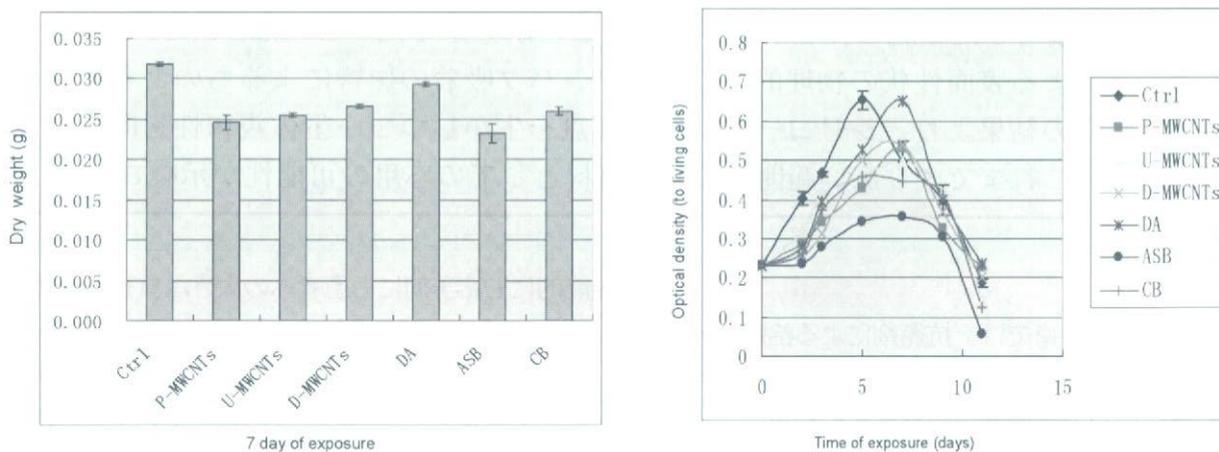


Figure 2 Dried weights (average values of three measurements) of the suspension cultured T87 for the control samples (Ctrl) and those with addition of P-MWCNTs, U-MWCNTs, D-MWCNTs, carbon blacks (CB), the zwitterionic dispersant (DA), and asbestos(ASB), respectively (left-figure).

Figure 3 Viability measurements ($n = 3$) obtained using triphenyl-tetrazolium reduction assay. The suspension cells were incubated with TTC for 24 h at 25 °C in the dark. The samples were then centrifuged for 5 min at 500rpm, TTC solution was aspirated and cells were subsequently incubated in 1 ml of 98% ethanol for 20 h at 55 °C. After centrifugation for 5 min at 8800 rpm, the absorbance of supernatant was read at 485 nm (right-figure).

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

カーボンナノチューブをコートした
シリコンラバーでの細胞接着に関する研究

分担研究者	戸塚靖則	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	高師則行	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	赤坂 司	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	松岡真琴	北海道大学歯学研究科大学院生
主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授

研究要旨 本研究では、柔軟性や形成性に優れているものの生体親和性の乏しいシリコンラバーに対して、細胞増殖性の優れたカーボンナノチューブ(CNTs)を応用することで、より生体親和性の高い生体材料の開発に関する検討を行った。シリコンラバー表面にCNTsをコートした材料を作成し、まず表面構造の走査型顕微鏡(SEM)による観察、表面粗さの測定、接触角の測定、アルブミン吸着の測定を行った。さらに、これを細胞培養スキャホールドとして細胞培養を行い、増殖細胞数の計測、SEMによる細胞の形態観察を行った。その結果、CNTsをコートしていないシリコンラバーに比べコートした方で約9倍の接着細胞数の増加が認められた。また、表面CNTs量の多い方が、接着した細胞の伸展が良好であることが分かった。これは、CNTsをコートすることによる表面性状の物理的な変化やタンパク吸着の影響によるものと考えられる。これらの結果より、シリコン材料の利点を生かしつつ、生体親和性を向上させることで、これまでより広い範囲での生体材料としての応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

頭頸部の悪性腫瘍では、抗癌剤による治療や放射線治療、外科的手術など、様々な治療法が行われている。腫瘍組織が広範囲な場合、これら複数の治療法を組み合わせたり、外科的手術により広範囲に腫瘍組織を切除する必要がある。現在、それらの手術による欠損部に対する再建方法としては、チタンなどの金属プレートを用いた再建や、自家組織の移植などが行われている。

骨などの硬組織部分は、チタンなどの金属製プレートを使用した再建を行うことができるが、軟組織を広範囲に切除した場合は人工物での再建が困難なため、自家組織の移植による再建に頼らざるを得ない。しかしながら、自家組織を移植した場合、患部に対する手術に加え、健常部の組織に大きな侵襲を加えることになる。これは手術後長期にわたって、

機能的にも審美的にも患者への大きな負担の一部となる。

現在、シリコン材料は欠損部に対するエピテーゼとして使用されている。これらのエピテーゼは、彩色したシリコン製の補綴物を、接着材や磁石などのアタッチメントを使用し欠損部に着脱するという形態となっている。また、美容外科の分野では、シリコン材料がプロテーゼとして使用されている。シリコンは生体反応性が低く急性の炎症などは起こさないものの、生体に対する親和性がないため周囲組織の被膜形成並びに拘縮などによる変形などの問題が多い。

一方、カーボンナノチューブ(CNTs)は、その機械的、電気的特性から様々な分野での応用が期待され、バイオ分野ではCNTsを用いたスキャホールド上での細胞培養など様々な研究が行われている。わ

れわれの研究グループではCNTs スキャホールド上でのヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) の培養を行い良好な増殖を認めている。

そこで、われわれはシリコン材料の柔軟で形成性が良いという利点を生かし、さらにCNTsの細胞増殖性を利用しシリコン材料の生体親和性を向上させることで、生体インプラント材料としてこれまでより広い範囲への応用が可能になるのではないかと考えた。今回の研究ではシリコンラバー表面にCNTsをコートすることによる細胞接着性の向上に関する検討を行った。

B. 研究方法

シリコンラバーのコートニングは、カーボンナノチューブ (CNTs) をエタノール中に超音波で分散させ、シート状のシリコンラバー上に塗布し乾燥させ行った。単層カーボンナノチューブ (SWCNTs) は名城ナノカーボン社製、多層カーボンナノチューブ (MWCNTs) はNanoLab社製のCNTsを使用した。それぞれ表面CNTs濃度の異なる5種類のシリコンラバー(1 μ g, 2.5 μ g, 5 μ g, 7.5 μ g, 10 μ g CNTs/cm²)を作製した(図1-1)。コートニングした表面構造の観察は走査型電子顕微鏡 (SEM) により行った。また、表面粗さの測定、接触角の測定、アルブミンの吸着試験を行った。

表面粗さはSURFCOM 130A (株)東京精密を用い粗さ曲線を測定し、それぞれの試料表面の算術平均粗さ (Ra)、最大粗さ (Rmax) を求めた。接触角はCNTsコートしたシリコンラバー表面に蒸留水2 μ gを滴下し、高精細デジタルマイクロスコープで撮影しImageJ Drop analysis(LD-ADSA)を使用し測定した。アルブミンの吸着試験は、それぞれ20mm \times 20mmのシリコンラバーシートを蛍光標識したアルブミン溶液中2mlに浸漬し、アルブミン溶液の蛍光強度の減弱をシリコンラバーへのアルブミン吸着量として測定した。

つぎに、作製したシートを細胞培養スキャホール

ドとし細胞培養を行った。培養にはヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) を用いた。それぞれのスキャホールド上に2 \times 10⁴個の細胞を播種し、DMEMに10%FBSと1%PSNを添加したものを培地として用い、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂条件下で6日間培養を行った。コントロールとしてCNTsをコートしていないシリコンラバー上でも同様に培養を行った。

細胞数の計測および形態観察のため、培養した細胞をグルタルアルデヒドで固定し、サンプルを細胞数計測用と形態観察用の2つに分割した。計測用サンプルはDAPIによる染色を行い蛍光顕微鏡で観察し、それぞれのシート (n=3) で細胞数を計測し、接着細胞数を比較した。

形態観察用サンプルはエタノールでの段階的脱水後、乾燥させ、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察を行った。

C. 研究結果

作製したスキャホールド (10 μ g CNTs/cm²) を走査型電子顕微鏡で観察した結果、シリコンラバー表面をCNTsが網目状に覆っているのが観察された。SWCNTsが平面的に表面を覆っていたのに比べ、MWCNTsでは繊維径が太く湾曲しており表面の凹凸が強いようであった(図1-2)。また、表面粗さを測定したところ(図2-1)、コートしたCNTsの量が増加するにつれ、算術平均粗さ (Ra) (図2-2)、最大粗さ (Rmax) (図2-3)とも増加していた。SWCNTsとMWCNTs間では差はほとんど認められなかった。

接触角を測定したところ、平均接触角はシリコンでは104.3、10 μ g SWCNTs/cm²では105.4、10 μ g MWCNTs/cm²では121.8であった (n=3) (図3)。接触角に関してはCNTsをコートすることによる大きな変化は認められなかった。

アルブミンの吸着量の測定ではコートしていないシリコンラバー表面よりCNTsをコートしたシリコンラバーの方がアルブミン溶液の蛍光強度の減弱が大きく、アルブミン吸着量が多いことが示され

た。また、SWCNTs と比較してMWCNTs の方が吸着量が多かった (図4)。

次に、作製したシート上で細胞培養を行った結果、 1cm^2 あたりの接着細胞数は、 $7.5\mu\text{gMWCNTs/cm}^2$ シリコンラバーで最も多かった。接着細胞数には、ばらつきが見られたが、いずれの表面CNTs量でも、コートしていないシリコンラバーより約9倍の接着細胞数の増加が認められた (図5)。

培養した細胞を走査型電子顕微鏡で観察した結果、CNTs でコートしたシリコンラバー上ではコートしていないシリコンラバーに比べ細胞がよく伸展して増殖しているのが認められた。また、表面CNT量が少ないシリコンラバー ($2.5\mu\text{gSWCNTs/cm}^2$) では接着してはいるが伸展してない細胞を多く認め、表面CNTsの多いシリコン・ラバー ($10\mu\text{gSWCNTs/cm}^2$) では、接着した細胞がより良好に伸展している傾向があった (図6)。また、CNTs量が多い部分で特に細胞の仮足が発達して伸展しているのが観察された (図7)。

D. 考察

シリコンラバーは通常細胞接着性を持たないが、CNTs をコートすることで細胞接着性を獲得することが示され、SWCNTs、MWCNTs 共にいずれの表面CNTs量でも細胞接着を認めた。また、走査型電子顕微鏡写真の所見より、表面CNTsの少ないスキャホルド上では、付着してはいるが仮足が伸展していない細胞を多く認め、表面CNTs量の多いスキャホルド上では接着した細胞が強く伸展しているのが認められた。さらに個々の細胞でもCNTsが多い部分で仮足が伸展してCNTsと強く接着している様子が認められた。

つまり、表面にCNTsが存在することで細胞の接着に関しては有利な環境となるが、ある一定以上の表面CNTs量では接着細胞数には直接影響せず、CNTs量の増加は細胞の伸展に良好な影響を与えるものと考えられた。これらは、シリコンラバーの表面にCNTsが付着することによる表面構造の物理的な変化や、CNTsによるタンパクの吸着による影響と考えられる。今回の実験では $7.5\mu\text{gMWCNTs/cm}^2$ で接着細胞数が最も多くなったが、はっきりとした理由は分かっておらず、今後、表面

構造と細胞接着数に関してさらなる検討が必要と考える。

これらの結果より通常細胞接着性のないシリコンラバーにCNTsをコートすることで、シリコン材料としての利点を生かしつつ生体親和性を向上させることが可能になり、現在使用されているより広い範囲での生体材料としての応用の可能性が示唆された。

E. 結論

シリコンラバーにCNTsをコートすることで、シリコンラバーの細胞接着性を向上させることが可能になった。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1. 松岡真琴、赤坂 司、橋本 剛、戸塚靖則、亘理文夫、“カーボンナノチューブコートしたシリコン・ラバーでの細胞接着”、厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」、第3回研究成果発表会要旨集、P52、北海道、登別市 2007
2. 松岡真琴、赤坂 司、橋本 剛、戸塚靖則、亘理文夫、“カーボンナノチューブコートしたシリコン・ラバーでの細胞接着”、第5回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会講演要旨集、P22、愛知県、名古屋市 2007
3. 松岡真琴、赤坂 司、橋本 剛、戸塚靖則、亘理文夫、“カーボンナノチューブ上での神経細胞の培養”、厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」、第4回研究成果発表会要旨集、P54、北海道、苫小牧市 2008

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

無し

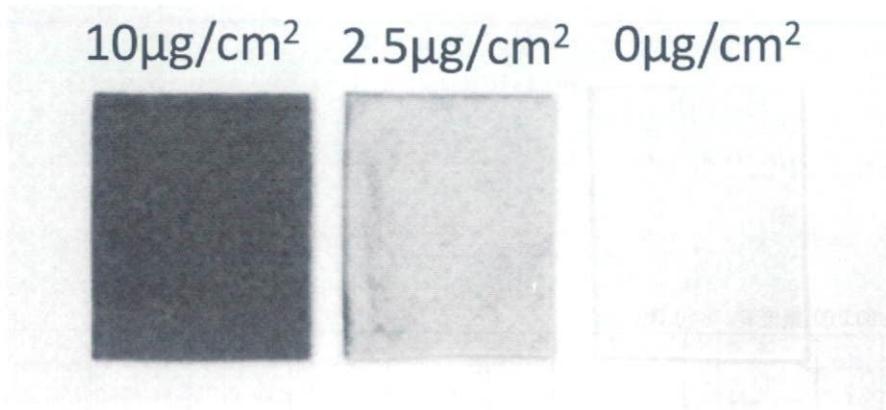
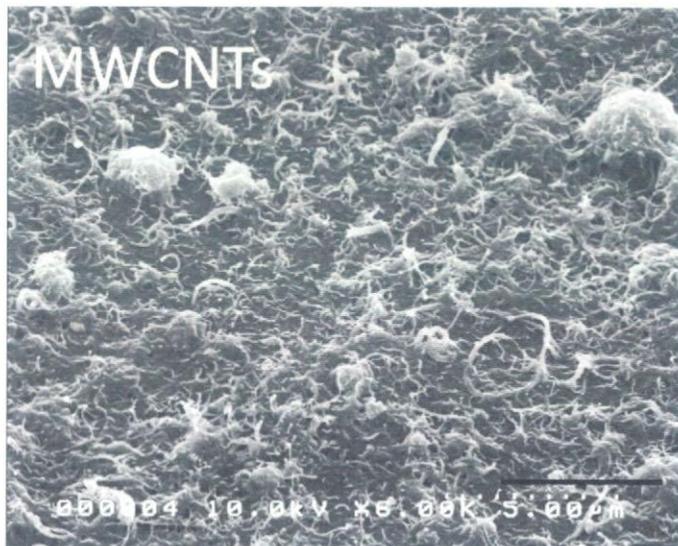
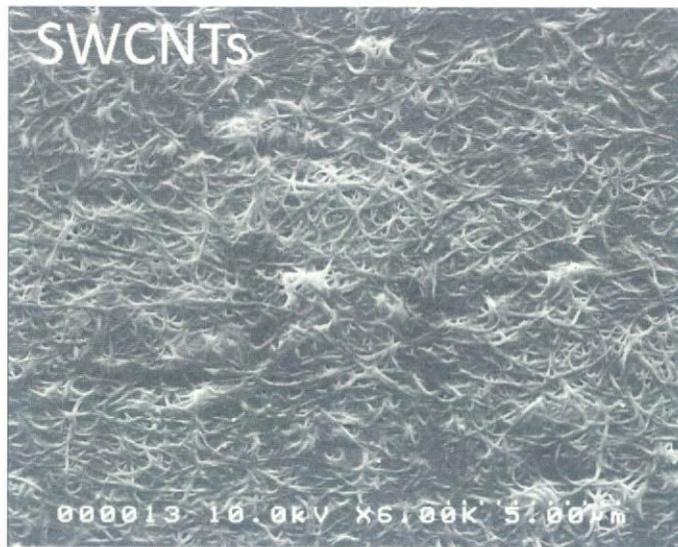


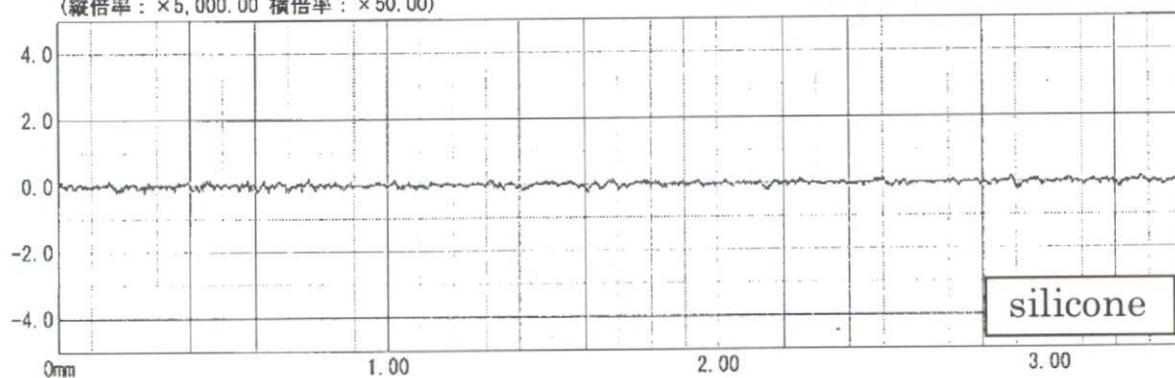
図1-1 CNTsでコートしたシリコンラバー



5 μm

図1-2 CNTsでコートしたシリコンラバーの表面構造 SEM写真

(μm) 粗さ曲線
(縦倍率: $\times 5,000.00$ 横倍率: $\times 50.00$)



(μm) 粗さ曲線
(縦倍率: $\times 5,000.00$ 横倍率: $\times 50.00$)

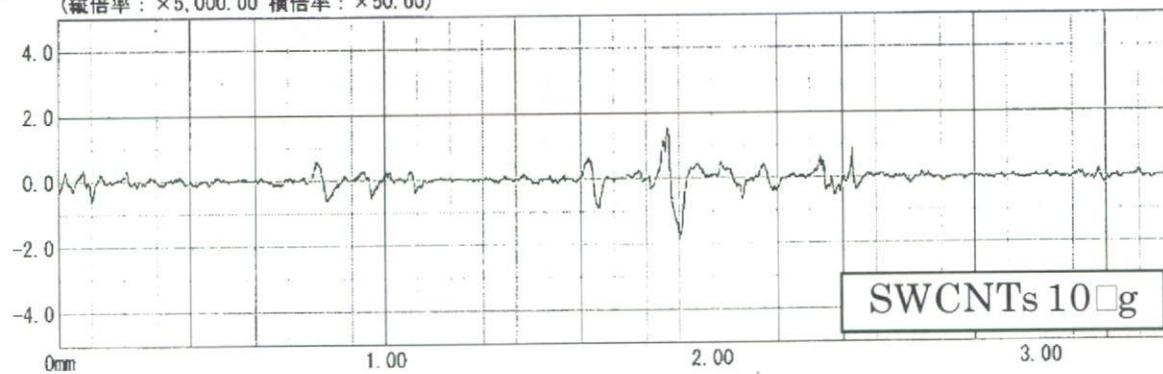


図2-1 silicone、 $10 \mu\text{gSWCNT}/\text{cm}^2$ の粗さ曲線

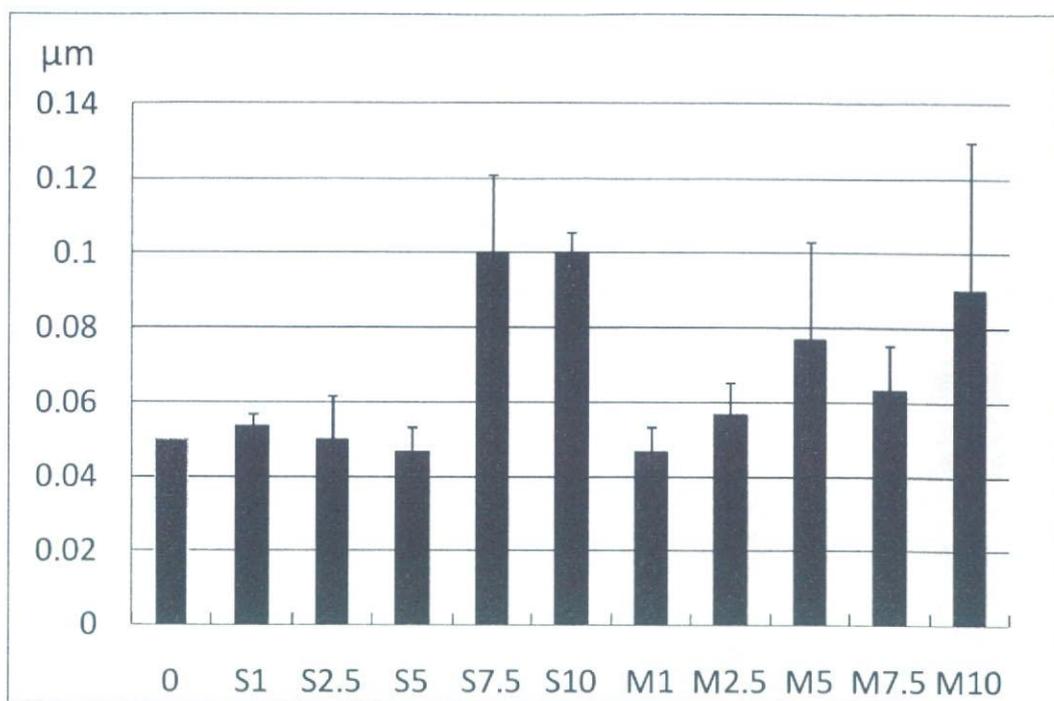


図2-2 算術平均粗さ(Ra)

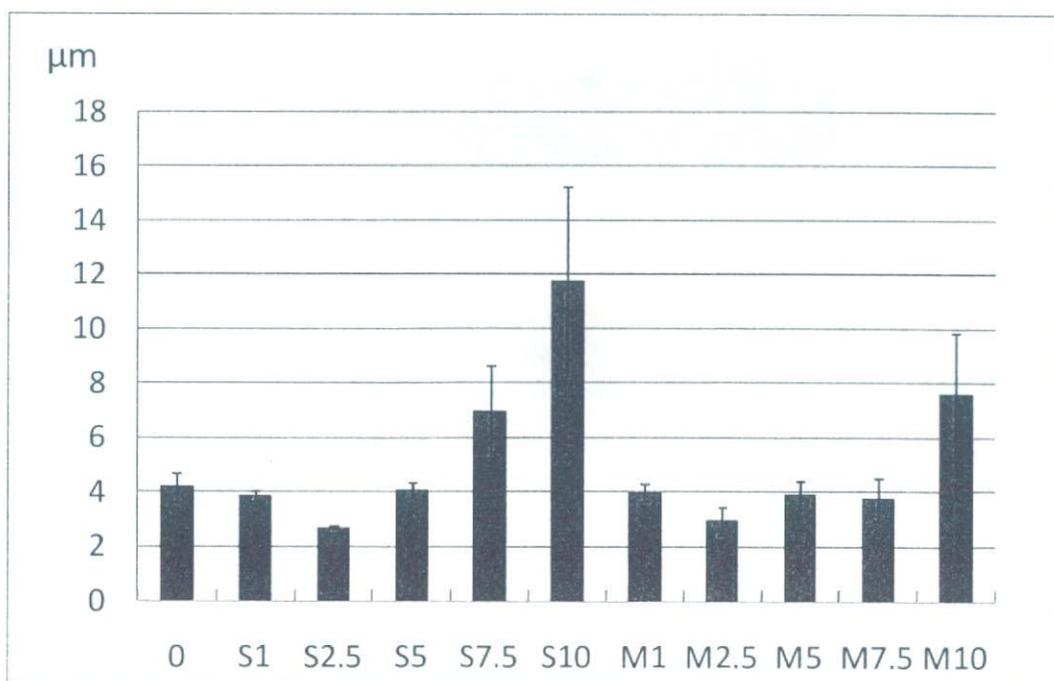
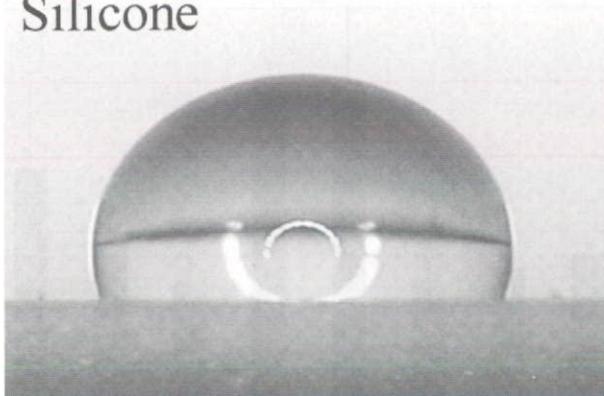
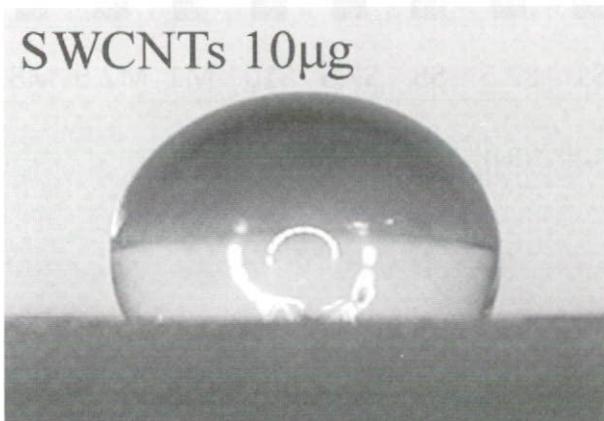


図2-3 最大粗さ(Rmax)

Silicone



SWCNTs 10 μ g



MWCNTs 10 μ g

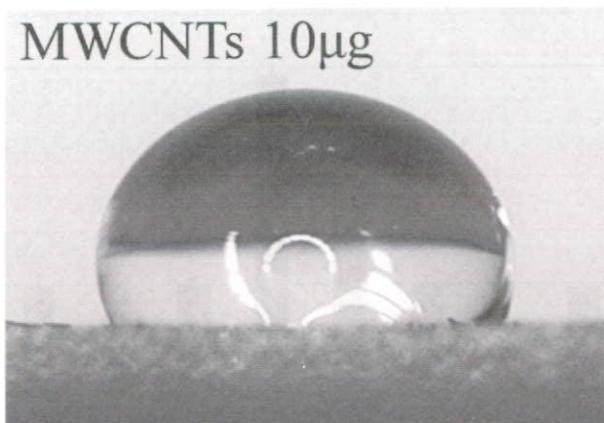


図3 デジタルマイクロスコープで撮影した蒸留水

蛍光アルブミンの吸着

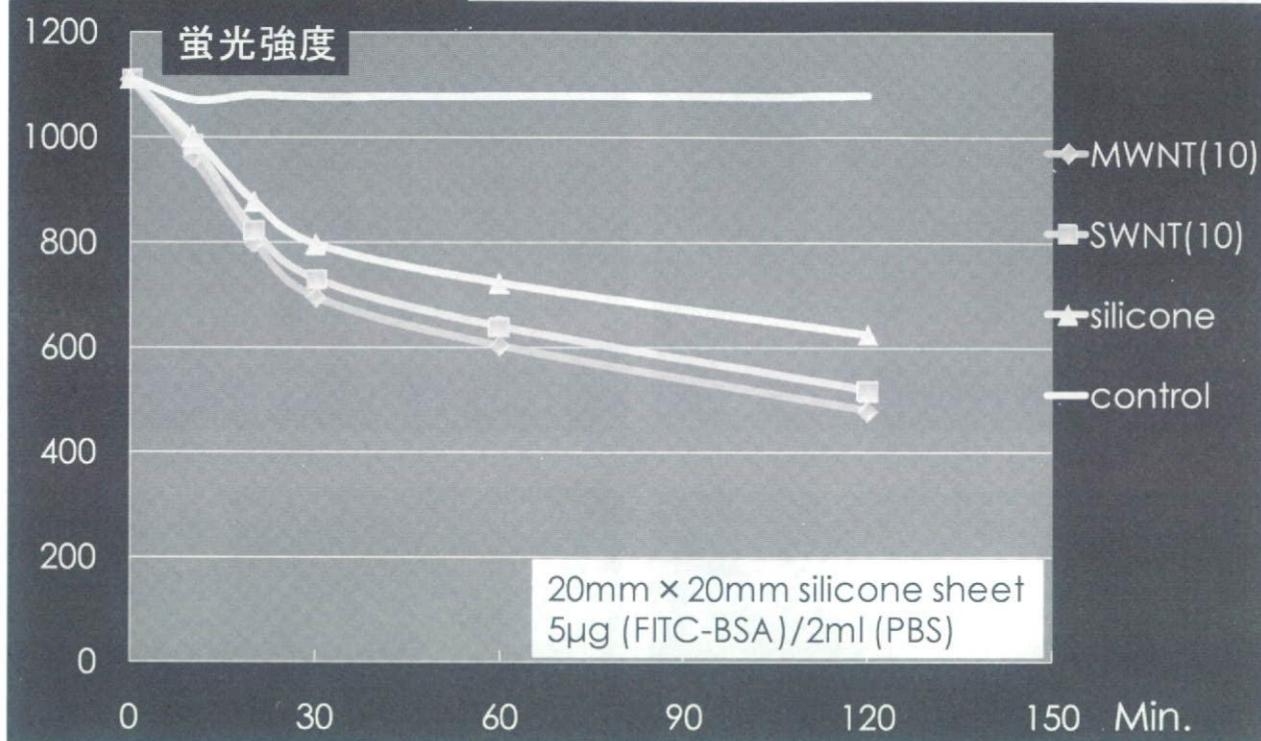


図4 CNTs をコートしたシリコンシートへのアルブミンの吸着

計測細胞数

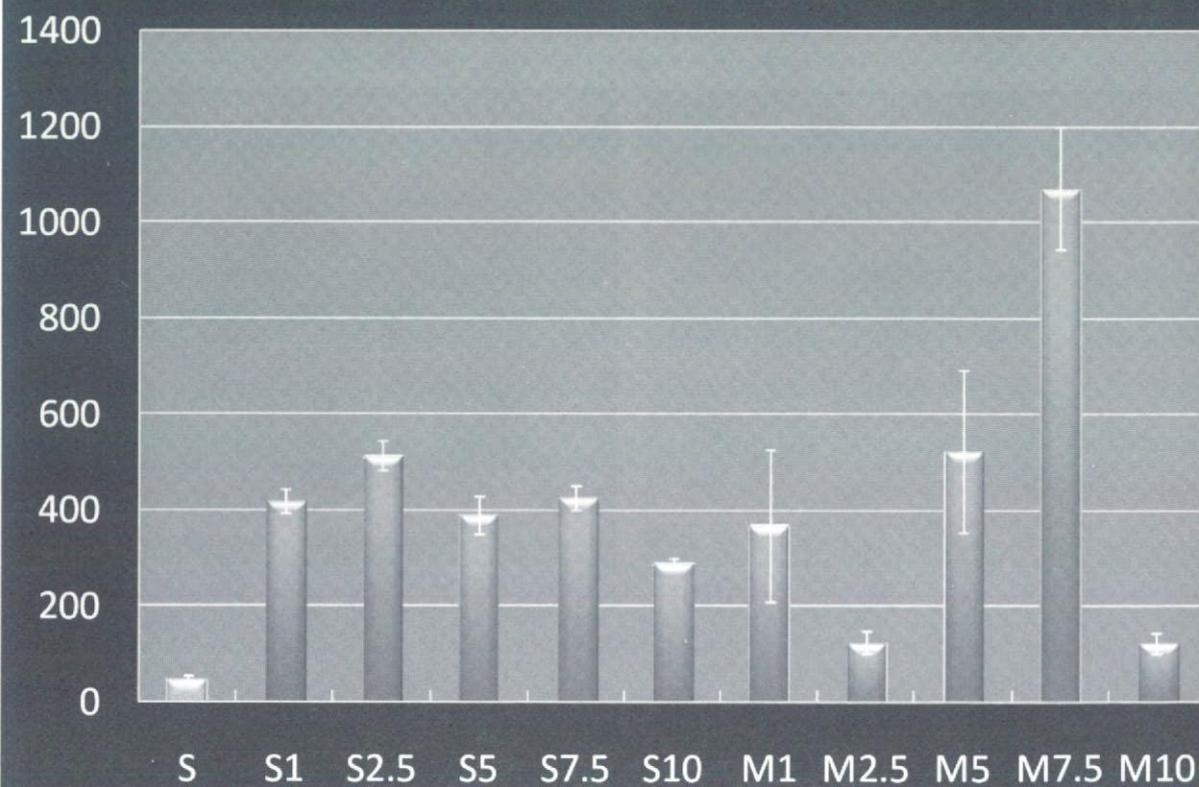
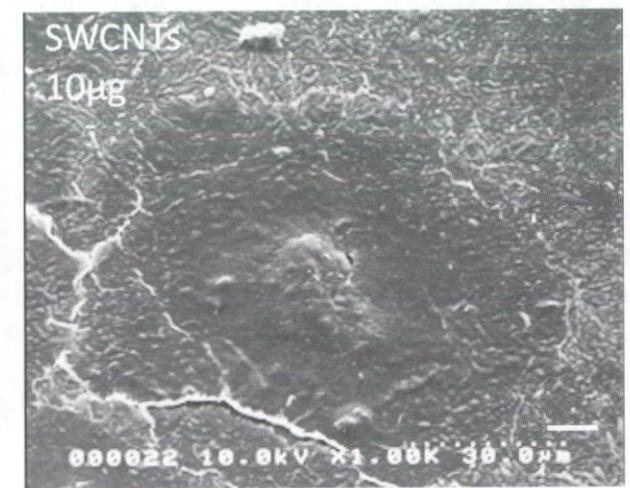
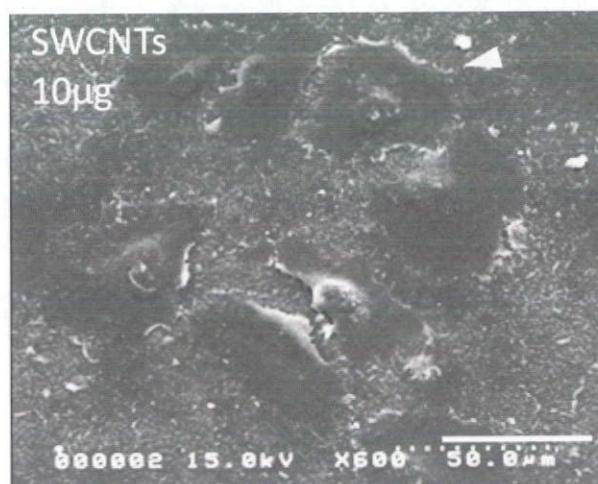
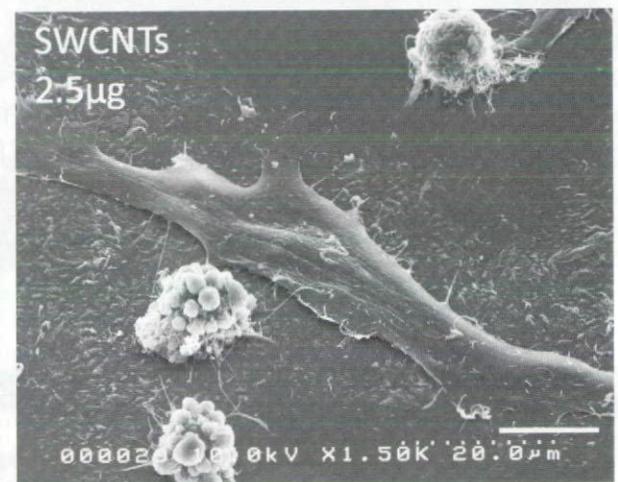
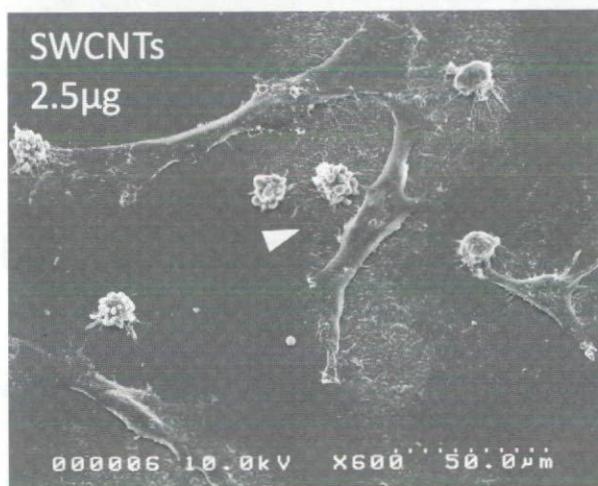
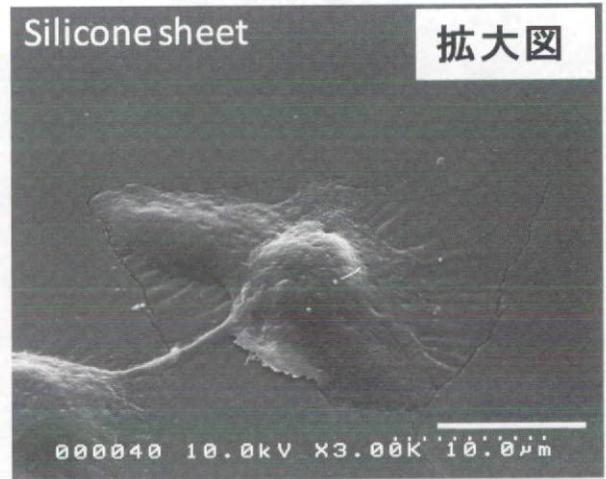
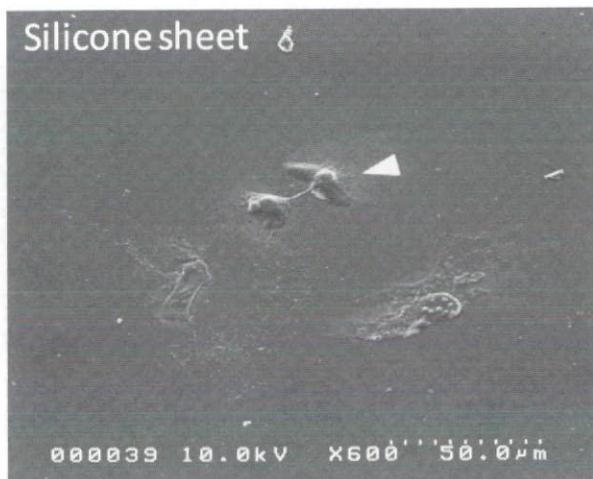


図5 CNTs をコートしたシリコンシートへの細胞接着数



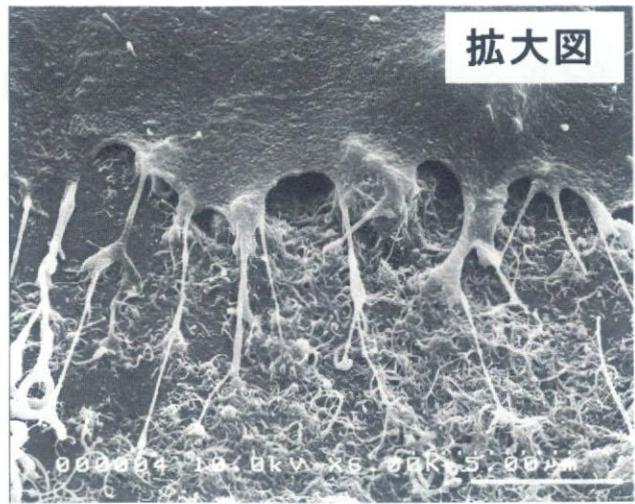
50μm

10μm

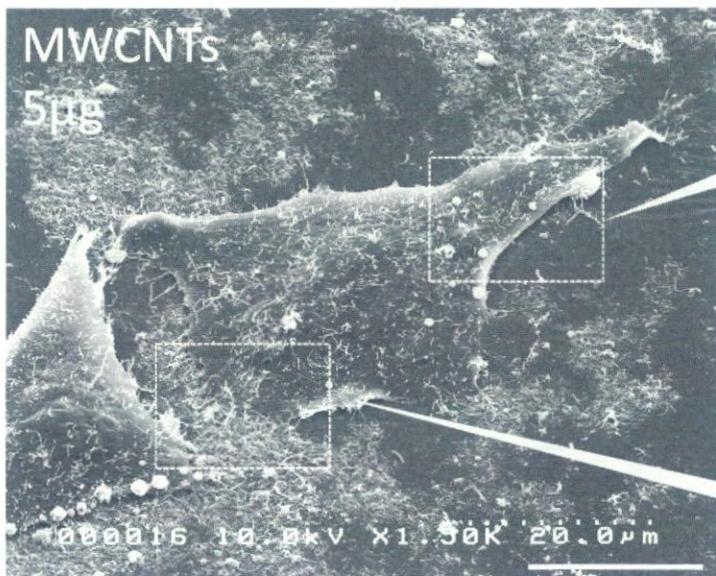
図6 SWCNTs 上での細胞 SEM 写真



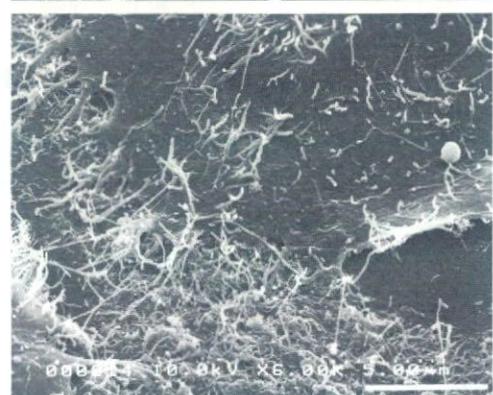
50µm



5µm



20µm



5µm

図7 MWCNTs 上での細胞 SEM 写真

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした
細胞培養担体の開発に関する研究と金属への応用

分担研究者	北川善政	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科准教授
研究協力者	寺田典子	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 本研究では、コラーゲンコートされたディッシュ（コラーゲンコートディッシュ）に細胞親和性のあるカーボンナノチューブ（CNTs）、特に多層カーボンナノチューブ（MWCNTs）を吸着させた、新たな細胞培養担体を開発した。カルボキシル化したMWCNTsを界面活性剤水溶液に分散することにより、安定したMWCNTs分散液が得られ、同分散液（100ppm）で1時間以上、コラーゲンコートディッシュを処理することにより、表面が均一にMWCNTsで被覆された培養ディッシュを作製することが可能であった。得られたディッシュは透光性であり、培養中の細胞を光学顕微鏡観察することが可能であった。これは従来のCNTs培養担体にはない性質である。この担体上で培養した細胞はコラーゲンコートディッシュに比べて約70%と高い活性が認められ、細胞増殖率も遜色がなかった。またコラーゲンコートディッシュでは数分で全細胞が剥離する条件でもCNTsコートディッシュ上では30分以上も細胞が残存しており、極めて高い細胞付着能を持つことが判明した。以上より、特徴的な新しい細胞培養担体としての可能性が示唆された。さらに、金属（チタン）表面にコラーゲンをコートし、その上にMWCNTsをコートすることにより、金属表面にMWCNTsを均一にコートする方法を開発した。MWCNTsコートチタンを動物皮質骨に埋入することによりMWCNTsコートチタンでも骨形成が起こることを確認した。

A. 研究目的

カーボンナノチューブ（CNTs）は、炭素6員環が連なった直径数nm～数十nm、長さ数 μ m程のグラフェンシートを筒状に丸めた構造をとり、強度、電気的特性、化学的安定性など優れた特性を持っている。最近では青木等の報告（Aoki N, et al. J.Biomed.Nanotechnol.2005; 1(4)）などから、CNTsには高い細胞親和性があることも知られており、コラーゲンとも高い親和性があることも判明している。

他方では、細胞培養用ディッシュであるコラーゲンコートディッシュは、高い細胞付着性を持つことから細胞培養に頻用されている。また、既存のCNTsを用いた細胞培養担体は、CNTs自体の黒色によって透過性がなく、細胞観察などはSEMを用いることがほとんどであり、その製作過程も煩雑なものが多い。そこで、我々は化学的に安定で水溶液に対し分散性の悪いCNTsの分散性を高くし、コラーゲンコートディッシュにCNTsを吸着させるという簡便

な作製方法にて、特徴的な細胞培養担体の開発を目的とし、研究を行った。

現在、歯科用インプラントは、インプラント体を埋入するさい方法として、二回法、即時埋入法などがあるが、どの方法を選択したとしても早期の骨結合が求められている。そこで、存在する歯科用インプラントは、生体親和性、耐食性の高いチタンを用い、骨との結合を強固にさせるべく、インプラント体の構造を工夫することや、表面構造を変化させ早期の骨結合を図っている。表面加工では、プラズマ溶射法や放電加工法などでその表面を粗造にし、骨とオステオインテグレーションさせているもの、インプラント体表面にハイドロキシアパタイトをコーティングし、オバイオインテグレーションさせているものなどがある。しかし、インプラント体と骨との間に一層の糖蛋白が介したり、製造過程が煩雑となっていたりする。

我々の開発した細胞培養担体、MWCNT コートディッシュは、組織親和性があり、高い細胞付着能を持つことから、現存する歯科用インプラントよりもより強固に骨と結合できる可能性考えられた。また、MWCNT コートディッシュの作製は簡便であることから、MWCNT コートディッシュの作製技法を用いて、MWCNTs を使用した新たな歯科用インプラントの表面構造の開発を目的とし、研究を行っている。

B. 研究方法

B-1 細胞培養担体の開発

1. コラーゲンコートディッシュへの MWCNTs コーティング条件の検討

a) MWCNTs (CNT Inc.) を 500°C×90 分酸化処理し塩酸洗浄して精製した。さらに、分散性を高めるため親水基を付与した (H. Peng et al., JACS, 125, 2006)。

b) より MWCNTs の分散を高めるため、界面活性剤として、1%コール酸ナトリウム水溶液 (東京化成) を用いた (Ishibashi A, et al. Chem. Eur. J. 2006; 12)。

c) MWCNTs が 1~1000pm となるように各々の濃度のコール酸ナトリウム水溶液に分散させた (以降、MWCNTs 分散液と呼ぶ)。

d) コラーゲンコートディッシュ (φ35mm, IWAKI) に MWCNTs 分散液 2cc を注ぎ、1~6 時間静置にして MWCNTs をディッシュ表面に吸着させ、洗浄・乾燥した。(以降 MWCNT コートディッシュと呼ぶ) また一部 SEM 観察用にコラーゲンコートカバーガラス (φ25mm, IWAKI) にも同様の処理を施した。(以降 MWCNT コートカバーガラスと呼ぶ)

e) 得られた MWCNT コートディッシュ (カバーガラス) 表面の MWCNTs の付着状態を SEM (日立製作所, S-4000) にて観察した。

2. 細胞毒性、細胞活性、細胞の SEM 観察、細胞の付着性の検討

a) MWCNT コートカバーガラス表面に、ラット線維芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を 1×10^5 cells/dish となるよう播種した。培地は α -MEM (Minimum Essential Medium, GIBCO™) + 10%FBS (biowest) を用い、37°C、5%CO₂にて 1~3 日間培養とした。

b) 経時的 (培養 1、2、3 日) に①細胞毒性の評価②SEM での観察③細胞付着性を解析した。

①細胞毒性 (培養後、ギムザ染色 (Giemsa's solution(MERCK)) を行い形態観察も同時に行った。)

i) 細胞活性: Alamer blue (BIOSOURCE) を用いた比色測定で、 $\lambda=570\text{nm}$ と $\lambda=600\text{nm}$ の吸光度差を測定した。

ii) 細胞質増殖率: 通法に従い固定、ギムザ染色後、光学顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE TS100) 観察により、細胞数を数え、細胞数から細胞増殖率を求めた。

②SEM 観察: 通例に従い固定・臨界点乾燥を行い、SEM 観察を行った。

③細胞付着性: コンフレントになるまで培養した状態で、PBS 溶液に 0.1%トリプシン EDTA と 0.02%トリプシン EDTA を溶解し、2cc ずつ MWCNT コートディッシュとコラーゲンディッシュに作用させ、細胞数の変化を経時的に観察した。

B-2 インプラント表面の開発

1. チタン表面へのコラーゲンコーティング条件の検討

a) 1.0mm チタン線 (ニラコ) を emery paper にて

粗研磨、鏡面研磨し、6mm に切断する（以降、それぞれ粗研磨 Ti、研磨 Ti と呼ぶ）。

b) 研磨 Ti を 3-Aminopropyltriethoxysilane（東京化成）にてアミノ化し、0.1%アテロコラーゲンを 1、3 時間作用させた（以降、コラーゲンコート Ti と呼ぶ）。

c) 得られたコラーゲンコート Ti に MWCNTs 分散液を 3 時間作用させた（以降、MWCNT コート Ti と呼ぶ）。

d) 粗研磨 Ti、研磨 Ti、コラーゲンコート Ti、MWCNT コート Ti の表面を、SEM にてコラーゲンと MWCNTs の吸着を観察した。

e) MWCNT コート Ti の一部に擦過を加え、コラーゲンの厚みを SEM にて観察した。

2. 動物実験における骨再生の検討

a) 12 週齢雄 WKAH 系ラットを実験動物として用いた。ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射 (35mg/kg/body) により全身麻酔を行なった後、頭部皮切を加え、粘膜骨膜剥離を行なった。頭蓋皮質骨に骨バーにて groove を入れ、24 時間紫外線滅菌した研磨 Ti、コラーゲンコート Ti、MWCNT コート Ti を埋入し、定位縫合した。

b) 埋入 7 週後、ラットにジエチルエーテル (WAKO) を吸入させ、安楽死させた。試料を頭蓋骨ごと摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液 (WAKO) に浸漬後、Villanueva Bone 染色 (WAKO)、樹脂包埋し、約 130 μ m 厚の組織標本を作製した。

c) 光学顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE 80i) 観察にて骨の状態を確認した。

(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委員会の承認を得て、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

C-1 細胞培養担体の開発

1. コーティング条件による MWCNTs の付着状態の変化と最適コーティング条件についての結果。

a) MWCNTs の濃度の影響: Fig.1 に示すように、MWCNTs の濃度が 10ppm 以下ではほとんど

MWCNTs は吸着しないが、100ppm 以上になるとコラーゲン上に吸着された。しかし、MWCNTs の濃度が高くなれば、凝集体量も多くなることが確認された。

b) MWCNTs 作用時間の影響: 作用時間が長くなればコラーゲン上に MWCNTs が均一に付着し、付着量が多くなったが、凝集体も多くなった。特に作用時間が 6 時間では 3 時間の作用時間より顕著に凝集体が見られた (Fig.2)。

c) 100ppm MWCNTs 分散液を 3 時間作用させ作製された MWCNTs コートディッシュは、Fig.3 に示すように少しグレーがかってはいるものの、透過性が非常に高かった。

2. MWCNT コートディッシュ上での細胞培養試験の結果。

a) 細胞の形態:

光学顕微鏡 (Fig.4-1,2): MWCNT コートディッシュ上の細胞は、コラーゲンコートディッシュ上の細胞と比較して細胞個数がやや少なく、細胞 1 個 1 個の広がりも小さいことが観察された。

SEM 像: 光学顕微鏡と同様に、MWCNT コートディッシュ上の細胞は、コラーゲンコートディッシュ上の細胞と比較して細胞個数がやや少なく、細胞 1 個 1 個の大きさも小さめで細長く、広がりも小さいことが観察された (Fig.5-1,2)。また、コラーゲンコートディッシュ上の細胞の偽足は基質に平たく接していた (Fig.5-3) が、MWCNT コートディッシュ上の偽足は MWCNTs に接しているように見られた (Fig.5-4)。

b) 細胞活性: MWCNT コートディッシュの細胞活性は、コラーゲンコートディッシュより初期からやや活性が低かった。

細胞増殖: MWCNT コートディッシュの細胞増殖率はコラーゲンコートディッシュの細胞増殖率よりやや低かった (Fig.6)。

c) 細胞付着性試験: 0.1%、0.02%トリプシン EDTA を用いて細胞剥離を試みたところ、コラーゲンコート上の細胞が 10 分以下で剥離してしまうのに対し、MWCNT コートディッシュ上の細胞は、30 分以上長く基質に留まっていた。MWCNT コートディッシュの方がコラーゲンコートディッシュより有意に細胞付着能があることが確認された (Fig.7)。

C-2 インプラント表面の開発

1. チタン表面へのコラーゲンコーティングの結果

a) 粗研磨 Ti の表面には大きな凹凸が確認されたが、研磨 Ti では凹凸がなく、平坦であり、鏡面研磨されていた。コラーゲンコート Ti の表面は研磨 Ti 表面とは異なり、コラーゲンの付着が確認できた。MWCNT コート Ti 表面はコラーゲンコート Ti 表面と異なり、MWCNT が吸着しているのが認められた (Fig.8)。

b) コラーゲンが Ti に付着されているのが確認され、コラーゲンの厚みは作用時間が3時間の方が1時間より厚かった。両時間とも MWCNTs が吸着されているのが確認された (Fig.9)。

c) Fig.10 に示した組織像では、粗研磨 Ti の周囲に Ti の弧に沿って薄い紫色に染色された細胞が確認された。コラーゲンコート Ti と MWCNT コート Ti の周囲には Ti の弧に沿って薄い青色に染色された細胞が確認された。しかし、Ti 周囲には骨や類骨を示す薄茶色の組織像や、薄赤色の組織像は確認されなかった。

D. 考察

1. 水溶液中への分散が困難である MWCNTs に親水基を付与し、コラーゲンナトリウム水溶液にて分散を行うことにより、MWCNTs を均一に分散することができた。
2. コラーゲンコートディッシュ表面に均一かつ緻密に MWCNTs が吸着し、凝集体がほとんど存在しない MWCNT コートディッシュの作製には、100ppm MWCNTs 分散液を用い、分散液を3時間作用させたものが最適であることが判明した。
3. 最適条件で作製された MWCNT コートディッシュは、透過性を持ち、光学顕微鏡観察が可能であった。
4. MWCNT コートディッシュ上の MWCNTs は洗浄や培養でも剥離することなく安定していた。
5. MWCNT コートディッシュでの細胞活性、細胞増殖率ともコラーゲンコートディッシュにやや劣るものの、コラーゲンコートディッシュの高い組織親和性を考慮するとほぼ同等の組織親和性があると考えられる。
6. MWCNT コートディッシュ上の細胞はトリプ

シン EDTA 処理を行っても剥離しにくく、高い細胞付着性を持っていることが明らかとなった。

7. MWCNT コートディッシュは、細胞親和性、高い細胞付着性を持つことから、選択性細胞採取などの特徴を持った新たな細胞培養担体としての可能性が示唆された。

8. チタン上にコラーゲンを介して均一に緻密に MWCNTs を吸着させることができた。また、洗浄によっても剥離することなかった。

9. Ti 上に付着させたコラーゲンは、作用時間が1時間であってもその上に MWCNTs が十分に吸着していた。このことから、コラーゲンの最適作用時間は1時間であると考えられた。

10. 動物実験において、十分な埋入期間をおいにも関わらず MWCNT コート Ti の周囲に骨が確認されなかったことから、動物実験の実験系自体を再検討する必要があると考えられた。

7. 今後、MWCNT コート Ti を用いて *in vitro*, *in vivo* の研究を追究していく。

E. 結論

MWCNT コートディッシュは、新たな特徴を持った光学顕微鏡観察が可能な細胞培養用担体の可能性が示唆された。

チタン表面にコラーゲンを介して MWCNTs をコートした MWCNT コート Ti を作成することに成功した。

今後は、MWCNT コート Ti を用いて *in vitro*, *in vivo* にて、生体組織親和性と骨との結合を確認していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kyan M, Onodera Y, Iizuka T, Notan K, Kohgo T, Kitagawa Y, Shindoh M: N-acetylglucosaminyltransferase V expression is implicated in malignant phenotype of human tongue squamous cell carcinoma. *Oral Medicine & Pathology* 10: in press, 2006.
2. Minowa K, Sakakibara N, Yoshikawa H, Omori K, Kitagawa Y, Inoue N, Totsuka Y, Nakamamura M: CT and MRI findings of the intraosseous Schwannoma of the mandible: a case report. *Dentomaxillofacial Radiology*: in press, 2006.

- 3) Ogasawara T, Miyoshi N, Sano K, Kitagawa Y, Yamada T, Ogawa T, Miyauchi K, Kinoshita H: Influence of administration methods on the accumulation of ALA-induced Pp-IX in mouse tongue tumors. *Oral Dis* 12(4): 415-419, 2006.
- 4) Yamazaki Y, Satoh C, Ishikawa M, Notani K, Nomura K, Kitagawa Y: Remarkable response of juvenile diffuse sclerosing osteomyelitis of mandible to pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*: in press, 2006.
- 5) Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Yoshimura H, Fujimura K, Kitagawa Y.: Specific expression of substance P in synovial tissues of patients with symptomatic, non-reducing internal derangement of the temporomandibular joint: Comparison with clinical findings. *Br J Oral Maxillofac Surg*. In press, 2006.
- 6) Yamazaki Y, Satoh C, Ishikawa M, Notani KI, Nomura K, Kitagawa Y: Remarkable response of juvenile diffuse sclerosing osteomyelitis of mandible to pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 104: 67-71, 2007.
- 7) Minowa K, Sakakibara N, Yoshikawa H, Omori K, Kitagawa Y, Inoue N, Totsuka Y, Nakamura M: CT and MRI findings of the intraosseous Schwannoma of the mandible: a case report. *Dentomaxillofacial Radiology* 36: 113-116, 2007.
- 8) Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Yoshimura H, Fujimura K, Kitagawa Y: Specific expression of substance P in synovial tissues of patients with symptomatic, non-reducing internal derangement of the temporomandibular joint: Comparison with clinical findings. *Br J Oral Maxillofac Surg* 45(5): 372-377, 2007.
- 9) Sato J, Segami N, Nishimura M, Yoshitake Y, Kaneyama K, Kitagawa Y: Expression of interleukin 8 in synovial tissues in patients with internal derangement of the temporomandibular joint and its relationship with clinical variables. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103(4): 467-474, 2007.
- 10) Kondoh N, Ohkura S, Arai M, Hada A, Ishikawa T, Yamazaki Y, Shindoh M, Takahashi M, Kitagawa Y, Matsubara O, Yamamoto M: Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 43: 455-462, 2007.
- 11) Minowa K, Inoue N, Ohmori K, Sakakibara N, Kuroshima Y, Totsuka Y, Kitagawa Y, Nakamura M: Vacuum phenomenon in non-open fracture of the mandibular condyle: report of 3 cases. *Dentomaxillofacial radiology* 36(2): 113-116, 2007.
- 12) Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Kitagawa Y: Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 21: 291-296, 2008.
- 13) J.Sato, J.Goto, T.Kato, M.Terada, A.Sato, Y.Kitagawa: Thrombocytopenia associated with loxoprofen sodium: a case report. *Asian J Oral Maxillofac surg* 19(4): in press, 2008.
- 14) Yamazaki Y, Saitoh M, Notani K, Tei K, Totsuka Y, Takinami S, Kanegae K, Inubushi M, Tamaki N, Kitagawa Y: Assessment of cervical lymph node metastases using FDG-PET in patients with oral squamous cell carcinoma. *Annals of Nuclear Medicine*: in press, 2008.
- 15) Hata H, Kitamura T, Higashino F, Hida K, Yoshida K, Ohiro Y, Totsuka Y, Kitagawa Y, Shindo M: E1AF, an ets-oncogene transcription factor expression highly correlates with malignant phenotype of malignant melanoma through upregulating membrane-type-1 matrix proteinase gene. *Oncol Rep*: in press, 2008.

2. 学会発表

- 山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖則、滝波修一、中村太保、北川善政：口腔扁平上皮癌頭部リンパ節転移におけるFDG-PETとCTの診断能に関する比較研究。第24回日本口腔腫瘍学会総会（シンポジウム3）口腔癌とPET。2006年1月26日、小倉。
- 齊藤正晃、北川善政：口腔癌におけるPET診断。平成18年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業。2006.5.16、支笏湖
- Yamazaki Y, Kitagawa Y, Saito M, Notani K, Tei K, Totsuka Y, Takinami S, Tamaki N: Comparative study of FDG-PET with CT in assessment of cervical lymph node metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma” Society of nuclear medicine 53rd annual meeting June 4, 2006, San Diego.
- Y. Kitagawa, K. Sano, M. Nakamura, T. Ogasawara, H. Okazawa, Y. Fujibayashi, N. Sadato, Y. Yonekura: FDG-PET to Evaluate Response to Intraarterial Chemoradiotherapy for Organ Preservation in Oral Squamous Cell Carcinoma. Society of nuclear medicine 53rd annual meeting June 5, 2006., San Diego.
- 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖則、佐藤隆文、滝波修一、中村太保、北川善政：頭頸部癌頭部リンパ節転移におけるFDG-PETとCT、USの診断能に関する比較研究 第30回日本頭頸部癌学会。2006.6.15。大阪
- Yamazaki Y, Kitagawa Y, Saito M, Notani K, Totsuka Y, Takinami S, Tamaki N: Preoperative lymph node staging of oral cancer using FDG-PET. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 88th Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition. Oct 5, 2006, San Diego.
- 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖

則、北川善政：頭頸部癌における MET-PET の有用性の検討第 51

回日本口腔外科学会総会. 2006.10.12. 北九州

8. 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖

則、滝波修一、北川善政：頭頸部癌における MET-PET の有用性

の検討. 33 回北海道頭頸部腫瘍研究会. 2007.2.17. 札幌

9. 寺田典子、宇尾基弘、久保木芳徳、北川善政、亘理文夫：コラ

ーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした細胞培養担

体の開発、第 49 回日本歯科理工学会学術講演会、2007.5.12-13、

北海道札幌市

10. Michiko Terada, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, Yoshinobu

Kitagawa, Fumio Watri: Development of multi walled carbon

nanotubes coated collagen for cell culturing and application to

metals. The 56th AAID Annual Meeting. 2007.11.7-11, Las

Vegas, USA

G. 知的所有権の取得状況

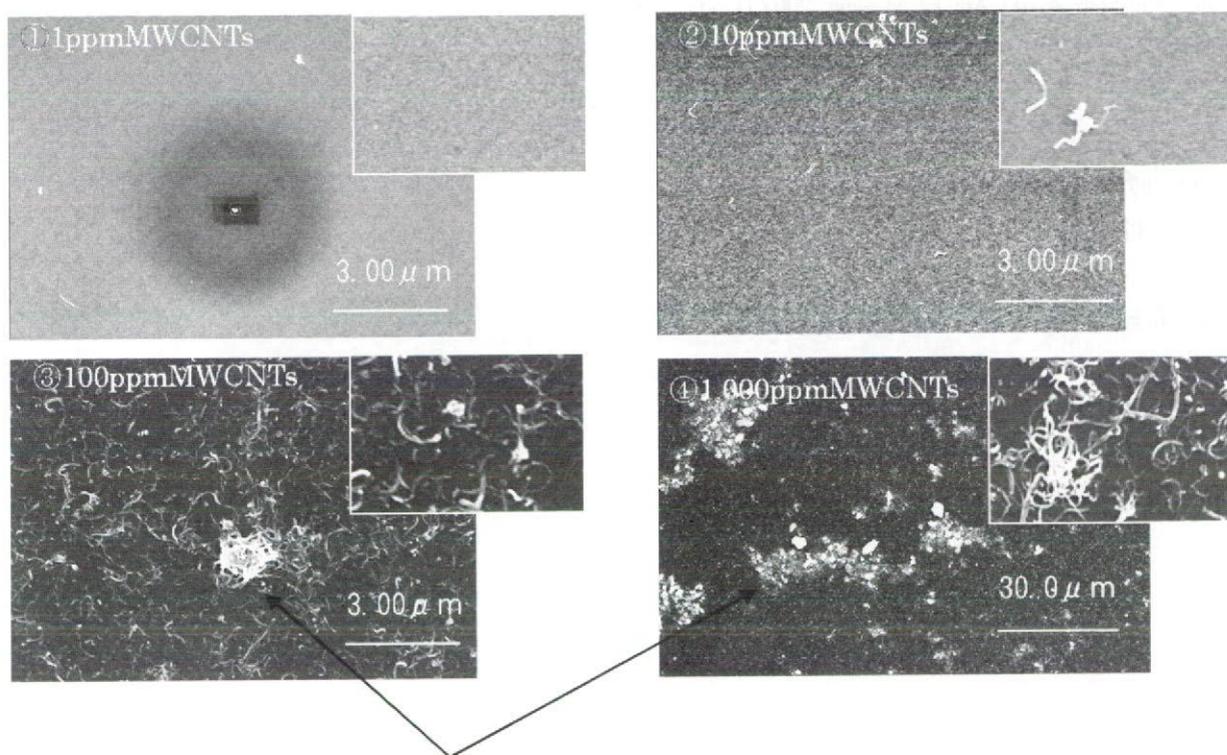
1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

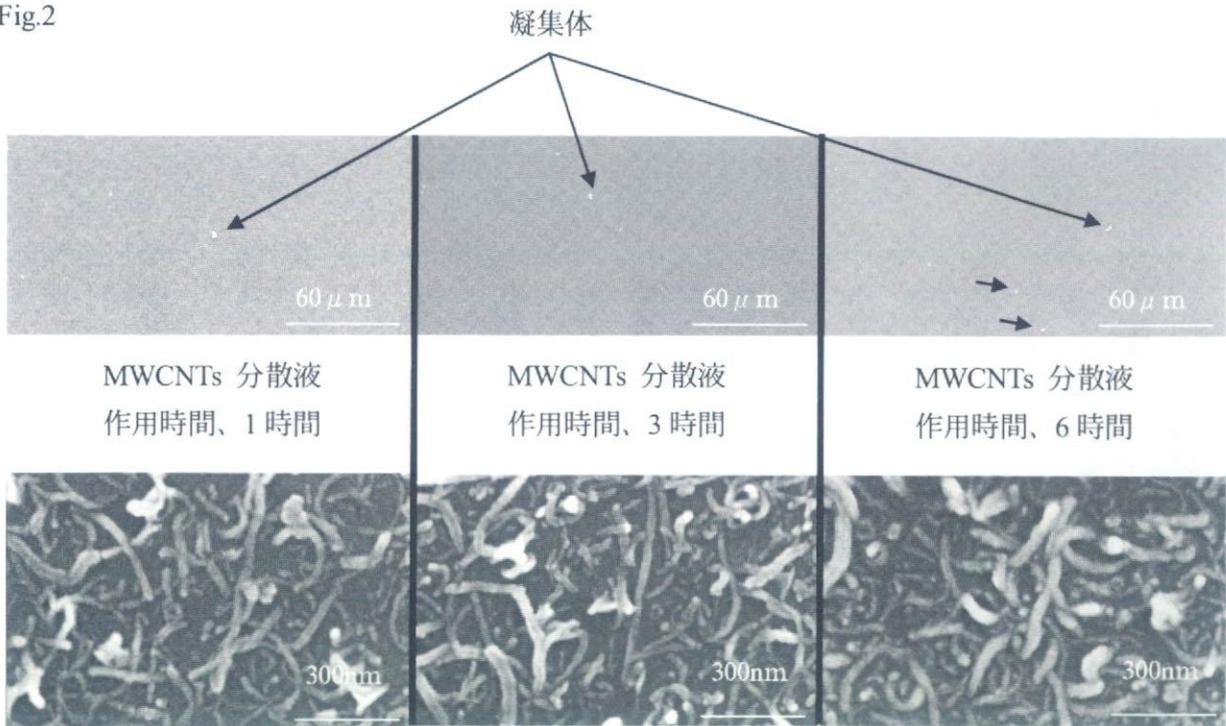
無し

Fig.1



凝集体
MWCNTsの濃度が高ければ、MWCNTsの付着量は増加するが、凝集体の量も増加する。

Fig.2



MWCNTs 分散液の作用時間が長ければ、MWCNTs の付着量は増加するが、凝集体の量も増加する。

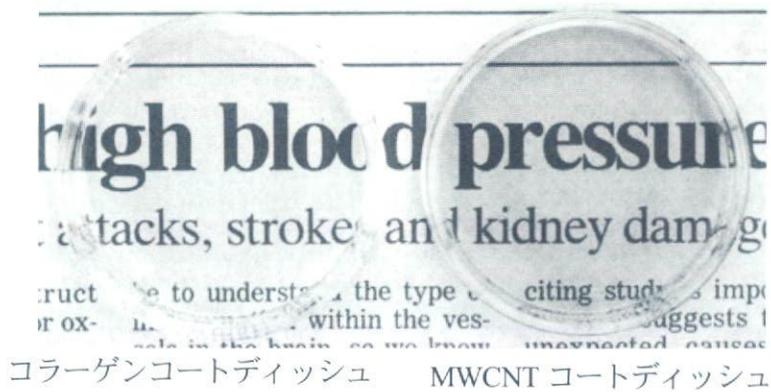


Fig.3 コラーゲンおよびMWCNTコートディッシュの光学像