

[2] ゴウリムシの遺伝学 樋渡宏一編 東北大学出版会 春本晃江「トリコシストの機能と遺伝」 pp132-135,1999

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Y. Saito, H. Kai, and K. Yada "High Resolution X-Ray Inspection Microscope Equipped with a Field Emission Gun and Its Application" Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. X-Ray Microscopy (2005) Himeji, IPAP Conf. Series 7 pp. 35-37
2. K. Yada, A. Ito and Y. Kinjyo "New Type of Targets for Projection X-Ray Microscopy of Samples consisting of Lighter Elements" Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. X-Ray Microscopy (2005) Himeji, IPAP Conf. series 7 pp. 143-144
3. K. Oohashi, K. Yada, K. Shirota, H. Kai and Y. Saito "Low-Voltage Projection X-Ray Microscope for Inspection of Lighter Elements" Proc. 16<sup>th</sup> Int. Micros. Conf. (2006) Sapporo, p. 1046
4. K. Yada "Recent Trends of Projection X-Ray Microscopy in Japan"

Proc. 19<sup>th</sup> Int. Conf. X-Ray Optics and Microanalysis and 43<sup>rd</sup> Annual Conf. X-Ray Chemical Analysis (2007) Kyoto, Elsevier in press

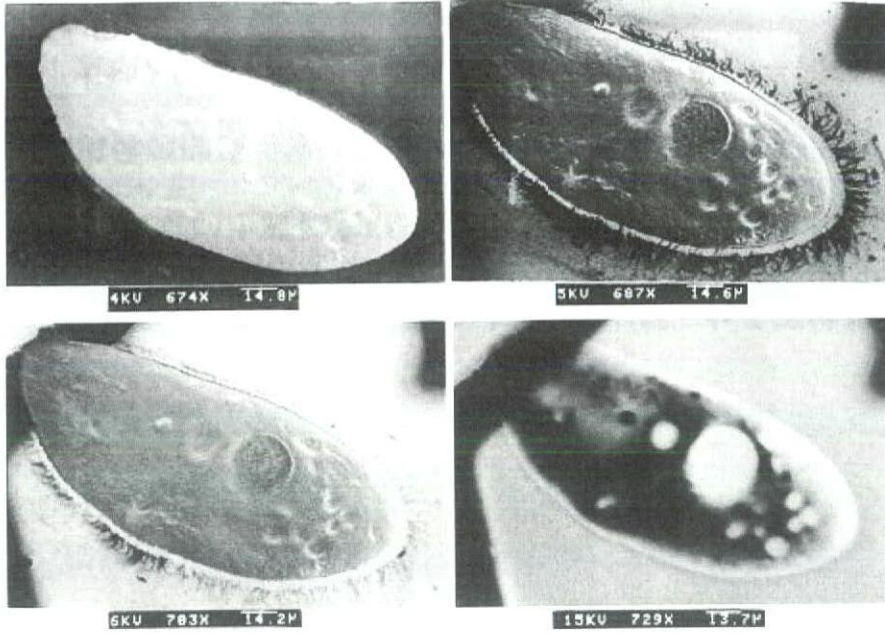
## 2. 学会発表

1. 齋藤 泰、甲斐廣海、代田耕平、矢田慶治 "分解能 0.1 $\mu$ m 以下超高分解能 X 線顕微検査装置" 第 68 回応用物理学会学術講演会予稿集 No.2, P.714 北海道工業大学 2007
2. 南 勝利、小口征男、矢田慶治 "低加速電圧 X 線顕微鏡による軽元素から成るサンプルの観察" 第 68 回応用物理学会学術講演会予稿集 No.2, P.714 北海道工業大学 2007

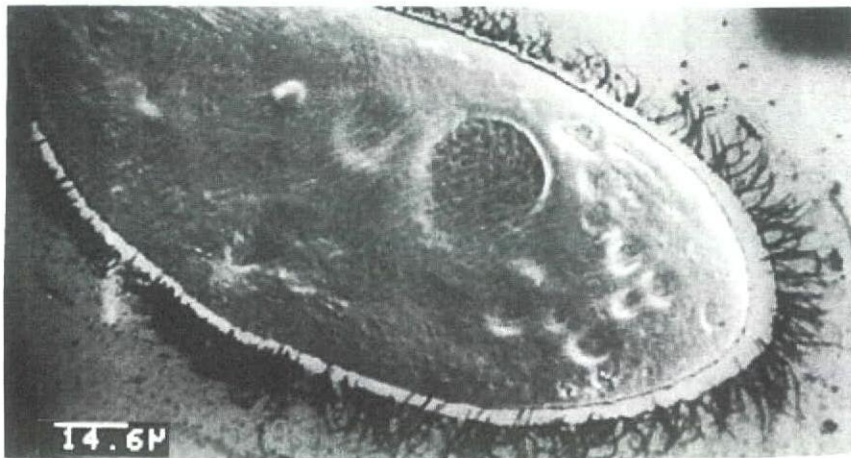
## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請中  
2 件
2. 実用新案  
無し

SEM images of *Paramecium caudatum*



☒ 1



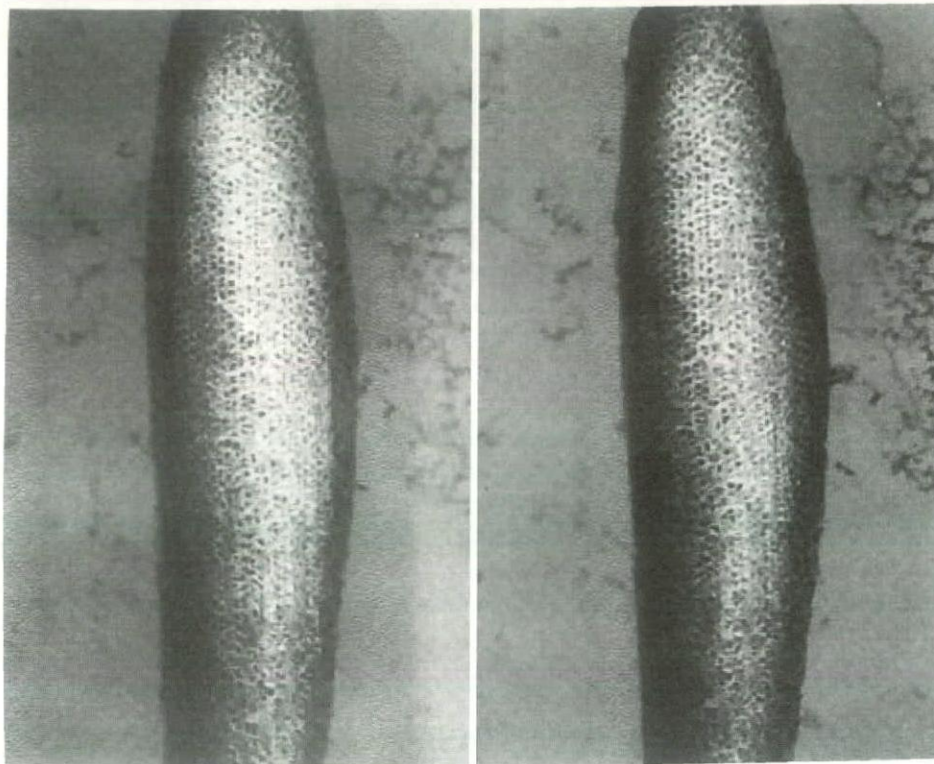
☒ 2

X-ray image Ge 10kV

LM image

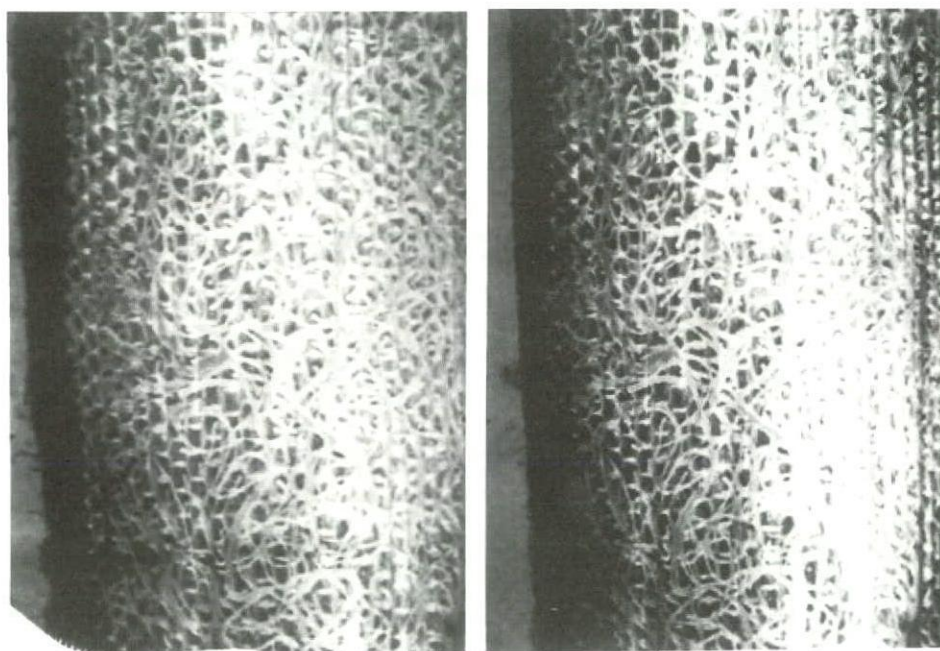


☒ 3



☒ 4

*Paramecium* : OsO<sub>4</sub> fix. + F.D.



☒ 5



*Paramecium* :OsO<sub>4</sub> fix.+ critical point drying

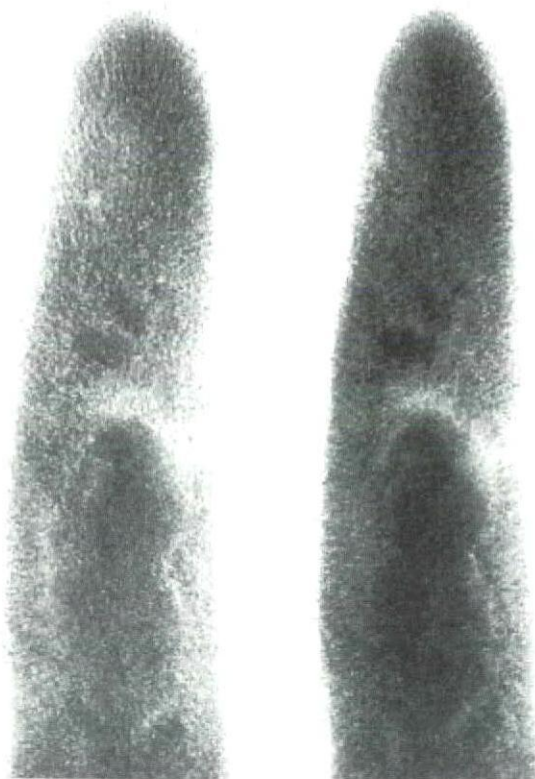
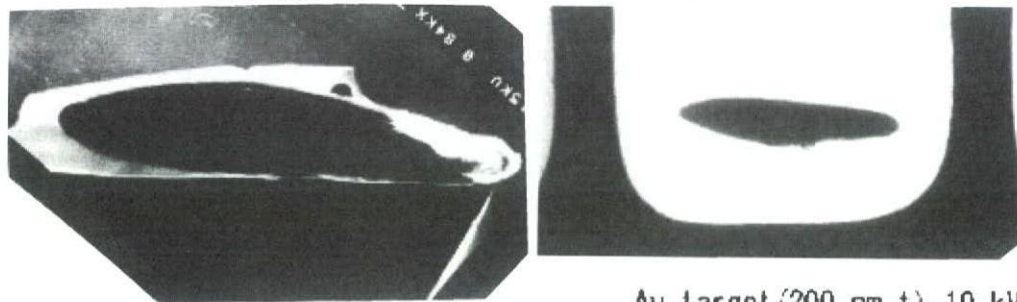


图 6

*Paramecium* :OsO<sub>4</sub> fix + freeze drying



Au target (200 nm t) 10 kV

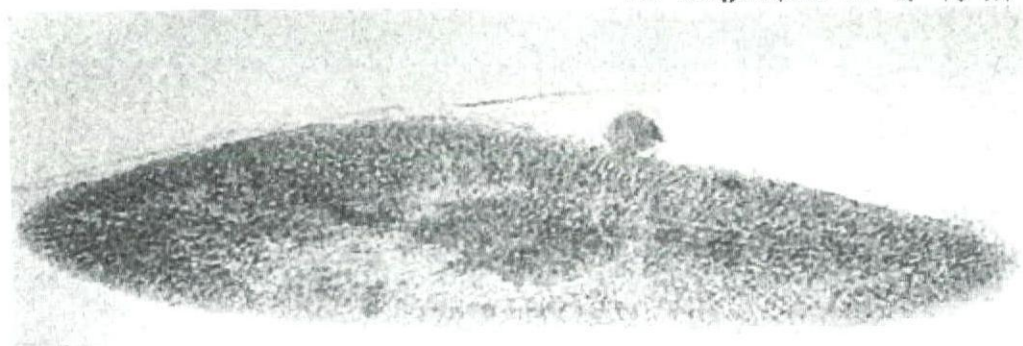
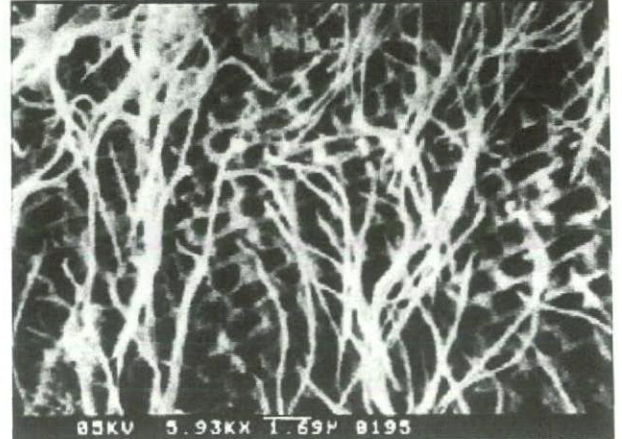
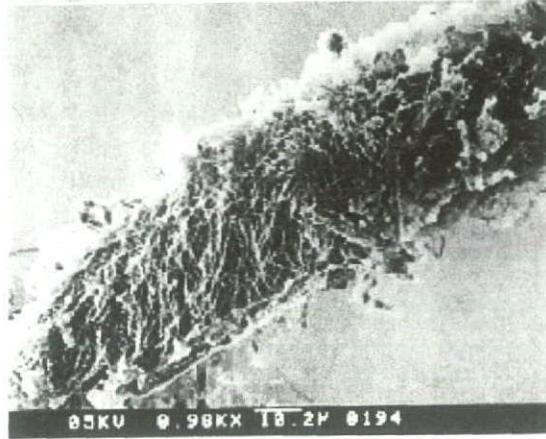
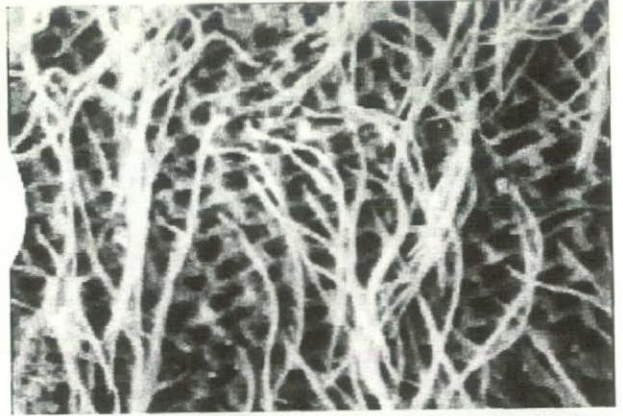
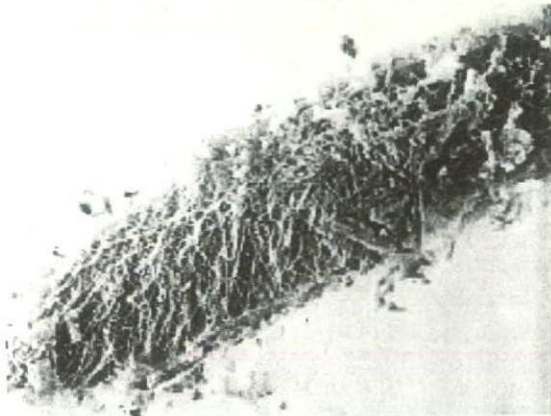
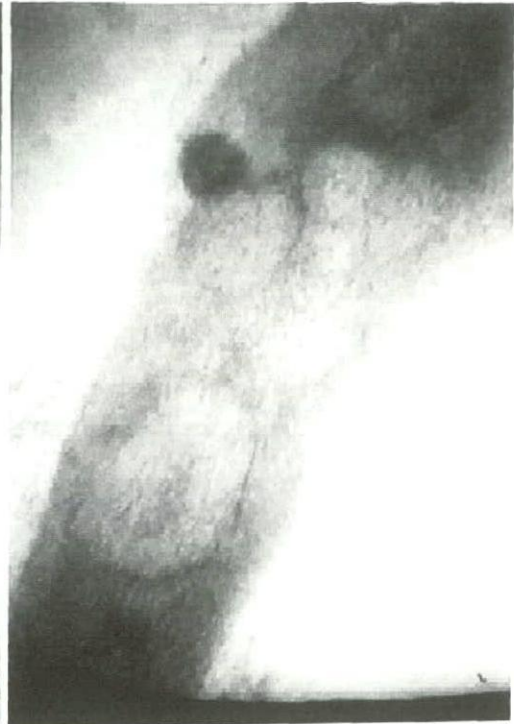


图 7

*Paramecium* : glutaraldehyde fix. + freeze drying



*Paramecium* : glutaraldehyde fix. + freeze drying 3<sup>o</sup>





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

フラーレンマーカートの合成およびカーボンナノチューブのバイオ応用

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
分担研究者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科准教授
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	阿部勲明	北海道大学歯学研究科助教

**研究要旨** 検出困難である炭素系ナノ微粒子の体内動態の可視化を目的として、レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラーレンマーカートの調製を検討した。目標化合物として糖鎖リガンドをフラーレン（C60）に共有結合し、細胞が有するレセプターや抗原に対する親和性を持ったフラーレン誘導体を分子設計した。合成の結果、ガラクトースまたはグルコースが1つまたは2つ結合したフラーレン誘導体の合成が達成できた。また水酸基の導入を検討したところ所定の条件下で反応時間を延長することにより、水酸基の導入率（20～35 個）が高く水溶性を示すフラーレン誘導体を収率よく合成することができた。得られたフラーレン誘導体はフラーレン化合物の体内動態検討に有効であると考えられる。

ナノ微粒子としてカーボンナノチューブ（CNT）を取り上げ、細菌として *S. mutans* との相互作用を検討した。*S. mutans* とカーボン材料での沈降実験では、ナノサイズ効果および凝集能力により 30-MWNTs が最も沈降率が高かった（低濃度 0.17mg/ml において、活性炭の約 8 倍の沈降率）。また、細いナノチューブ（SWNT, 30-MWNTs）においては、新規な捕捉様式である細菌表面に彎曲しながら絡みつく様子が観察された。以上の結果より、CNT を経口投与した場合には、口腔内細菌や腸内細菌とも相互作用する可能性が示された。

細胞培養への CNT コートの影響を検討した結果、CNT コートは各種細胞の細胞増殖を促進させた（SWNT において SaOs-2 は 1.2 倍、HeLa は 1.3 倍の促進）。また、検討した細胞種においては、MWNTs よりも SWNTs の方がより細胞増殖を促進することが明らかとなった。以上より、CNT を基材表面にコートした場合、強い毒性を示さず、逆に細胞増殖に対し良好な効果を示すことが明らかとなった。特に毒性の影響が強く現れることが知られている低血清培地においては SWNTs 上にて顕著な増殖促進効果（3.3 倍）が認められた。以上の結果より、CNT をろ過膜や培養基材表面へ固定した形態においては、SaOs2 に対し細胞毒性を示さず、逆に細胞培養に対して増殖促進効果を与えることが明らかとなった。このことより CNT は再生医療分野での細胞培養用スキャホールドとしての可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、ナノテクノロジーが急速な進歩を遂げ、研

究分野だけでなくナノテクにより生産された製品が一般市場にも見られるようになってきている。ナノ



微粒子に関しては、化粧品などとして販売されているにも関わらず、安全性については詳細に検討されていないのが現状である。ナノ微粒子の安全性を検討する際には、金属微粒子であればXSAM、EPMAなどを利用して体内動態を調べる方法が挙げられる。一方、炭素系ナノ微粒子に関しては適当なイメージング方法がないのが現状である。

そこで本研究では炭素系ナノ微粒子の体内動態の可視化を目的として、レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラーレンマーカークの調製を検討することとした。レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラーレンマーカークを目標化合物とし、糖鎖リガンドをフラーレン(C60)に共有結合し、細胞が有するレセプターや抗原に対する親和性を持ったフラーレン誘導体を分子設計した。

一方、最も注目されている材料の1つにCNT(CNT)が挙げられ、エレクトロニクス分野やエネルギー分野を中心に集中的な研究が進行中である。一方で、CNTのバイオ分野への応用研究も開始されており、AFMの探針、タンパク質の結晶化、バイオセンサーへの応用が注目を集めている。

はじめに、本研究ではナノ微粒子としてCNTを取り上げ、体内との初期接触の際に重要となる細菌との相互作用を検討した。そこで口腔内細菌の一つである*Streptococcus mutans*を選び、沈降および捕捉挙動を検討することとした。

次に、我々の研究グループでは、世界に先駆けCNT膜を細胞培養のスキヤホールドとして使用し、骨芽細胞様細胞(SaOs2)の培養を検討したところ、①良好な細胞増殖、②強い細胞接着、③細胞の進展、④トリプシンによる細胞剥離の耐性、⑤細胞の仮足とCNTの絡み合い、⑥アルカリフォスファターゼ活性の向上など興味ある特性を見出した。以上の細胞培養におけるCNTの特性は本来の利点や特性の一部であると推測され、CNTの毒性とともにさらなる詳細な検討が望まれている。そこでCNT薄膜を作製し、細胞培養に対するCNTコートの影響を検討した。

## B. 研究方法

水溶化のため、アセチル化ガラクトースを2分子結合したC60(10mg)をトルエン(5ml)に溶解し、NaOH 2g/H<sub>2</sub>O 2ml およびTBAHを5滴加えた。1時間激し

く攪拌後、エバポレーターにてトルエンを除き、50mlのH<sub>2</sub>Oを加え、さらに24時間反応を行った。後処理のため大過剰のメタノール(450ml)に反応混合物を加え、反応物を沈殿させた後、吸引ろ過(PTFE 0.2 μm)にてろ別した。メタノールにて3回洗浄後、60℃にて乾燥し、得られた乾燥物をH<sub>2</sub>Oに加え超音波を用いて分散させた。水に対しての不溶物を除くため、ろ過(孔系0.2 μm)を行った。その後、脱イオン水に対して5日間、透析(Cut-off 500)を行うことにより精製し、凍結乾燥して目的物を得た。

細菌との相互作用では、CNTは、精製度の高い単層CNT(純度90%以上、名城ナノカーボン製FH-P)および6N塩酸にて精製した直径約30nm多層CNT(純度80%以上、NanoLab製、30-MWNTs)、直径約200nm多層CNT(MTR Ltd., 200-MWNTs)を使用した。粒径約20 μmの活性炭素(関東化学社製)を選択した。

う蝕の原因菌の一つとして*Streptococcus mutans* JC2をハートインフュージョン(HI)液体培地にて増殖させ、遠心集菌し、 $1.4 \times 10^8$  CFUの懸濁液を作製した。菌懸濁液に対して一定の濃度(0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml)のCNT分散液をそれぞれ添加し、攪拌(200rpm, 5min)、遠心分離(700rpm, 20分)を行った。その後、上澄液を採取し、UV-vis吸光度測定器にて濁度(700nm)を測定した。相互作用の観察のため、沈降物は、通法に従い2.5%グルタルアルデヒドによる固定、段階脱水、臨界点乾燥後、走査型電子顕微鏡(SEM Hitachi S4000)にて観察した。

CNT薄膜は、CNTs分散液を6cmのポリスチレンディッシュ(for suspension culture, Corning社製)に薄層コートし作製した。その後、乾燥、UV滅菌し培養に使用した。細胞増殖試験は、CNT薄膜に対して、SaOs2細胞( $1 \times 10^4$ 個/dish)を播種し、DMEMに10%FBSおよび1%PSNを添加した培地にて、37℃で5%CO<sub>2</sub>環境下にて所定時間培養を行った。その後、PBSにて洗浄し、グルタルアルデヒドによる固定を行い、付着している細胞数を測定した。細胞形態の観察には、培養後、PBSにて洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド、オスミウム酸による二重固定した。その後、エタノールによる段階的脱水を行い、臨界点乾燥にて乾燥させた。走査型顕微鏡にて観察するため、Pt-Pdにより表面コートした。低血清培地による増殖率の検討は、SaOs2細胞( $1 \times 10^4$ 個/dish)を播



種し、DMEMに1%FBSおよび1%PSNを添加した培地にて、37℃で5%CO<sub>2</sub>環境下にて所定時間、増殖が一番早いサンプルで50%-70%コンフルエントになるまでインキュベートした。また、多種の細胞の影響を検討するため、MC3T3-E1(マウス頭蓋骨骨芽細胞)、ST2(マウス骨髄 間葉系幹細胞)、RPC-C2A(ラット歯髄細胞株)、KB(口腔扁平上皮がん)、HeLa(ヒト子宮頸部類上皮がん)、HEK293(ヒト胎児上皮細胞)、NIH-293(マウス胎児皮膚繊維芽細胞)を用い、個々の適切な細胞培養条件下にて培養し、増殖細胞数を測定した。

#### (倫理面への配慮)

なし

### C. 研究結果

レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラーレンマーカークの合成スキームを図1に示した。合成例として図1では糖にグルコースを選択し、アセチル化糖の結合したフラーレン誘導体をアセチル基の脱保護および水酸基の導入を同時に行うことにより水溶化して目的物を得た(図1)。得られたフラーレン誘導体の凍結乾燥物とその水溶液を図2に示した。

CNTおよび活性炭の*S. mutans*に対する沈降挙動を比較した結果(図3)、添加したいずれのカーボン材料も濃度が濃くなるに伴い上澄み液の吸光度が低下した。また、使用したカーボン材料の中では、直径30-MWNTsが最も効率よく上澄みの吸光度を低下させ、特に低濃度(0.17mg/ml)において、約80%の吸光度の低下が観察された。

続いて、相互作用の検討のため沈澱物のSEM観察を行った(図4)。その結果、活性炭では粒子状の表面に細菌が付着するのに対し、SWNTおよび30-MWNTsでは、菌体の表面に対し彎曲しながら絡みつく様子が観察された。一方、200-MWNTsではナノチューブの繊維上に沿う形で接触している様子が観察された。

次に、CNT薄膜の走査型電子顕微鏡による観察およびAFMによる表面粗さ(Ra)の結果(図5)を示した。走査型電子顕微鏡観察では、CNT薄膜であるSWNT0.5(0.5 μg/cm<sup>2</sup>)は表面にCNTバンドルのネットワークを形成するコート量であるのに対し、SWNT5(5 μg/cm<sup>2</sup>)はほぼ一面が覆われるコート量であった。

表面粗さはいずれも約7nmおよび16nmであった。AFMによる表面性状の観察の結果(図6)では、SWNT5コート表面は平滑な表面(Ra=16nm)を示すのに対し、MWNT5コートは、比較的粗い表面(Ra=45nm)を示した。

細胞培養に対するCNTコート量の影響を検討するため、SWNTsおよびMWNTsにて0.05 μg/cm<sup>2</sup>から5 μg/cm<sup>2</sup>の範囲内にてCNT薄膜を作製し、細胞増殖率で比較検討を行った図7。その結果、SWNTsおよびMWNTsの両方でコート量0.5 μg/cm<sup>2</sup>まで急激な増殖率の上昇が観察されたのに対し、それ以上では飽和または緩やかな増殖率の増加を示した。コート量0.5 μg/cm<sup>2</sup>で比較するとSWNTsでは1.2倍と高い値を示し、MWNTsでは0.8倍を示した。

次に、CNTの特徴を見出すため、低血清培地にてSaOs2を培養したときの増殖細胞数を図8に示した。その結果、SWNTsでは細胞培養用ディッシュに対し3.3倍の増殖促進効果、MWNTsでは1.0倍と同等の増殖率を示した。特に、SWNT薄膜では他の比較材料に比べて顕著な効果が表れた。各種細胞種による違いを検討した結果(図9)、CNTコートによりほとんどの場合にて細胞増殖率の向上が観察された。また、その効果は、細胞種に大きく依存し、SaOs-2、HeLa、HEK293、NIH-3T3では、市販細胞培養用ディッシュよりもSWNT-coated dishの方が高い増殖率を示した。傾向として、MWNTsよりもSWNTsの方が、増殖率を向上させる効果が高かった。

### D. 考察

マスマッピングを行うために、既知の方法にて合成を行った。レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラーレンマーカークの分子設計を行った。

- ① レセプターとの結合をより強くするため、リガンドとしての糖とフラーレンとの間にスパーサーとして炭素数2のエチレン基を介し結合する。
- ② C60との結合は後でマスマッピングするため、分裂しやすいように炭素ではなく窒素(アザ結合)を介した結合とする。
- ③ 会合状態を避けるためC60に水酸基を多数導入し水溶性とすることとした。
- ④ 糖リガンドは、肝実質時細胞上に存在しレセプター依存性のエンドサイトーシスを起こすこと



が知られているアシアログライコプロテインレセプター (ASGP) に選択的に結合するβ-ガラクトースとした。

- ⑤ リガンドはグリコシドクラスター効果が期待されるように C60 に対して2つ結合した化合物とした。

糖鎖と C60 のカップリング反応では、ガラクトースを1つ結合した C60 と2つ結合した C60 が同時に合成できるので、糖鎖が2つ結合した誘導体を中心的に合成した。得られたアセチル化糖を結合したフラーレンに層間移動触媒と水酸化ナトリウムを用いて、脱保護および水酸基の導入を検討したところ、12時間の反応時間では大部分の生成物が不溶性であった。より水酸基の導入率を高めるため反応時間を24時間と伸ばしたところ、水に不溶性の部分が減少することが判明した。動物試験による体内動態を検討するためには、微粒子のサイズ効果を避けるためにも水溶性の方が適切であると考えられる。また今後、水酸基の導入率を高めることにより水溶性フラーレンの収量が向上すると考えられる。

続く細菌との相互作用では、生体に CNT を投与した際に、接触することが予測される細菌との相互作用を検討のため、*S. mutans* に対する沈降および相互作用の様子を観察した。*S. mutans* と各種カーボン材料を混ぜ、沈降を検討した結果、いずれのカーボン材料の添加量の増加に従い、菌の沈降量も増加した。これらのことは、主にファンデルワールス力により菌体と付着し、凝集体を形成することで沈降したものと考えられる。30-MWNTs および 200-MWNTs では、さらにナノサイズの効果により凝集が促進したものと考えられる。一方、SWNTs の場合、凝集力が強すぎるため菌との相互作用する以前に SWNTs 同士による凝集体形成が起こるためと考えられる。

これらカーボン材料による *S. mutans* の捕捉様式を観察するため、凝集体の SEM 観察を行った。活性炭の場合は 20 μm 粒子表面に付着しているのに対し、SWNTs や 30-MWNTs では菌体表面に彎曲している様子が観察された。このような彎曲した捕捉様式は、200-MWNTs では観察されないことより、細いナノチューブの持つ柔軟性によるものと考えられる。この柔軟性による細菌の捕捉は、ナノサイズの効果であると考えられ、捕捉後の細菌の生育や除法に影響す

ると考えられる。

以上の結果より、カーボン材料はいずれも細菌を沈降させる機能があるが、適度な分散性およびナノサイズを持つことにより 30-MWNTs が強い沈降活性を示すことが判明した。また、細い直径をもつ SWNTs や 30-MWNTs では、直径 200nm の MWNTs やマイクロサイズを持つ活性炭では発現しなかった彎曲しながら捕捉することが判明した。

次に、固体表面上に CNT を固定した場合の細胞培養への影響を検討することを目的として、CNT 薄膜を調製した。

CNT-coated dish の表面形状を AFM にて観察した結果より、SWNT-coated dish の表面粗さは、16nm 以下と平坦であった。このことは、細胞培養への粗さの影響を低減できる材料と考えられる。

コート量の影響を検討した結果、0.5 μg/cm<sup>2</sup> と少量の CNT にて良好な増殖率を示すことが明らかとなった。このことより、細胞はディッシュ表面のすべてを認識しているのではなく一部を認識し、ディッシュ表面を覆い尽くす量の CNT が必要でないことを示していると考えられる。細胞培養用ポリスチレンディッシュと比較しても、SWNT0.5 で 1.2 倍、MWNT0.5 で 0.8 倍であり、SWNT では増殖率が高く広く一般的に使用されている細胞培養用ポリスチレンディッシュを超える増殖率が観察された。高い増殖率は、CNT の持つナノレベルでの凹凸および高いタンパク質吸着能が細胞増殖に有利に働くためと考えられる。以上より、表面に固定した CNT は細胞増殖に対して有利に働くことが明らかとなった。

再生医療やバイオ分野において、低血清培地での効率的な細胞培養は、BSE 問題やコスト削減、細胞機能の制御の点で望まれている。そこで、CNT 薄膜における低血清培地での培養を検討した。1%FBS における細胞培養を行った結果 (図8)、無処理ディッシュ、細胞培養用ディッシュ、細胞接着性ディッシュ、コラーゲンコートディッシュ、ポリリジンコートディッシュにおいては播種細胞数を超えないか、または増殖が効率的でないのに対し、SWNT では顕著な増殖促進効果を示した。これは、CNT のタンパク質吸着力および適度な凹凸を持つナノ構造が基本的な能力として、延命効果を発現し、SWNT ではさらに増殖促進効果を発現するためであると推測される。



一方で、低血清培地における培養は、毒性を示す材料であれば顕著な毒性を示すのに対し、逆に今回の検討では毒性を示さず、SWNT では顕著に、MWNT では良好な増殖を示した。このことは、固体表面に固定したCNTは *in vitro*において細胞毒性を示さないことが推測される証拠の一つとなることを示している。さらに低血清培地における増殖率の向上は、Stem Cellの未分化培養、トランスフェクションの効率化、分化誘導の効率化、コストダウンなどに有利に働く可能性がある。

各種細胞を用いて、増殖率の比較を行った結果(図9)、CNTコート基材はコートしていない基材に比べ明らかな増殖率の向上が観察された。CNTコート自体は細胞の増殖率に対しプラスに働く、細胞に対して強い毒性を示さないことが分かった。また、SWNTコートの方がMWNTコートよりも増殖率を向上させた。これはSWNTの持つタンパク吸着能力や平坦性が影響しているものと考えられる。しかしながら、その効果は細胞の種類により大きく影響した。このことよりある一定の培地条件において、細胞が求める足場材料の因子(タンパク吸着性、濡れ性、表面粗さなど)がそれぞれの細胞で異なり、そのためSWNTやMWNTコートに対する応答が異なったものと考えられる。今後は、より多くの細胞種での検討やCNTコートの種類を増やし細胞増殖を検討するとともに、CNTが細胞増殖を促進する機構の検討が必要であると考えられる。

## E. 結論

レーザーアブレーション/マススペクトル・マッピング用のフラーレンマーカートの合成を検討したところ、ガラクトースまたはグルコースが1つまたは2つ結合したフラーレンの合成が達成された。また水酸基の導入を検討したところ所定の条件下で反応時間を延長することにより、水酸基の導入率が高く水溶性を示すフラーレン誘導体を収率よく合成することができた。これらは動物試験による体内動態検討に有効であると考えられる。

次にナノ微粒子としてCNTを取り上げ、*S. mutans*との相互作用を検討した。その結果、*S. mutans*とカーボン材料での沈降実験では、ナノサイズ効果および凝集能力により30-MWNTsが最も沈降率が高かった(低濃度0.17mg/mlにおいて、活性炭の約8倍

の沈降率)。また、細いナノチューブ(SWNT, 30-MWNTs)においては、新規な捕捉様式である細菌表面に彎曲しながら絡みつく様子が観察された。以上の結果より、CNTを経口投与した場合には、口腔内細菌や腸内細菌とも相互作用する可能性が示された。

続いて、CNT薄膜を作製し、細胞培養に対するCNTの影響を検討した。その結果、SaOs2はCNT膜上において一般的な培養条件にて良好な細胞接着および細胞増殖を示した。細胞増殖においても同様にSWNTでは1.2倍・、MWNTでは0.8倍・と良好な増殖を示した。特に毒性の影響が強く現れることが知られている低血清培地においてはSWNTs上にて顕著な増殖促進効果を示し、SWNTでは3倍・の促進効果をしめし、CNTは細胞毒性を示さず逆に有益な影響を細胞に与えることが分かった。各種細胞培養へのCNTコートの影響を検討した結果、細胞種による効果の程度はあるもののCNTコートは各種細胞の細胞増殖を促進させた(SWNTにおいてSaOs-2は1.2倍、HeLaは1.3倍の促進)。また、今回検討した細胞種においては、MWNTsよりもSWNTsの方がより細胞増殖を促進することが明らかとなった。以上より、CNTを基材表面にコートした場合、強い毒性を示さず、逆に細胞増殖に対し良好な効果を示すことが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Akasaka T, Warari F, Sato Y, Tohji K. Apatite formation on carbon nanotubes. *Material science & Engineering C*. 26 (4), 675-678 (2006).
2. Akasaka T, Watari F. Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition. *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructure*. 16 (2): 114-125, 2008.
3. Akasaka T, Watari F. Capture of bacteria by flexible carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia*. 5: 607-612, 2009.
4. Akasaka T, Yokoyama A, Matsuoka M, Hashimoto T, Abe S, Uo M, Watari F. Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2) to carbon nanotube sheets. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2009, in press.
5. Akasaka T, Nakata K, Uo M, Watari F. Modification of the dentin surface by using carbon nanotubes. *Bio-Medical*



## 2. 学会発表

1. 赤坂 司, 宇尾基弘, 巨理文夫, “人工複合糖質高分子による *Streptococcus mutans* の増殖阻害”, 第2回「ナノトキシコロジーアセスとの微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会講演要旨集, p29 北海道, 札幌市 2006
2. 赤坂 司, 青木尚文, 宇尾基弘, 巨理文夫, “柔軟性CNTによるストレプトコッカスミュータンスの捕捉とその増殖”, 第31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, p108 三重県, 鈴鹿市 2006
3. 赤坂 司, 宇尾基弘, 巨理文夫, “人工複合糖質高分子による *Streptococcus mutans* の増殖阻害”, 平成18年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏季セミナー講演要旨集, p10 岩手県, 盛岡市 2006
4. 赤坂 司, 阿部薫明, 宇尾基弘, 巨理文夫, “人工複合糖質高分子による *Streptococcus mutans* の増殖阻害”, 第48回日本歯科理工学会講演要旨集, p336 愛知県, 名古屋市 2006
5. 赤坂 司, 阿部薫明, 宇尾基弘, 巨理文夫, “CNT上でのアパタイトの析出”, 第3回「ナノトキシコロジーアセスとの微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会講演要旨集, p18 宮城県, 仙台市 2007
6. 赤坂 司, 阿部薫明, 宇尾基弘, 巨理文夫, “人工複合糖質高分子による *Streptococcus mutans* の増殖阻害機構”, 第49回日本歯科理工学会学術講演会要旨集, P245 札幌, 札幌コンベンションセンター 2007
7. Akasaka T, Abe S, Uo M, Watari F. “Inhibition of Growth of *Streptococcus mutans* by Artificial Glyco-Polymer.”, Proceedings of the International Dental Materials Congress 2007. P338 Thailand, The Imperial Queen’s Park Hotel 2007
8. 赤坂 司, 横山 敦郎, 松岡 真琴, 橋本 剛, 佐藤 義倫, 田路 和幸, 阿部 薫明, 宇尾 基弘, 巨理 文夫, “単層CNT膜での骨芽細胞様細胞の培養”, 厚労省化学物質リスク研究事業「ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発」H18-化学一般-006 第3回研究成果報告会 抄録集, P7 登別, 第一滝本館 2007
9. 赤坂 司, 横山 敦郎, 土屋のりか, 松岡真琴, 阿部薫明, 宇尾基弘, 佐藤 義倫, 田路 和幸, 橋本 剛, 巨理文夫, “単層CNT膜上での骨芽細胞様細胞の細胞接着および細胞増殖”, 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」研究会要旨集P27 名古屋, ファインセラミックセンター 2007
10. 赤坂 司, 横山 敦郎, 土屋のりか, 松岡 真琴, 橋本 剛, 佐藤 義倫, 田路 和幸, 阿部 薫明, 宇尾 基弘, 巨理 文夫, “単層CNT 透明導電性薄膜での骨芽細胞様細胞の培養”, 厚労省化学物質リスク研究事業「ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発」H18-化学一般-006 第4回研究成果報告会 抄録集, P35 苫小牧, ホテル ニドム 2008
  11. 赤坂 司, 阿部薫明, 宇尾基弘, 巨理文夫, “単層CNT 透明導電性薄膜上での骨芽細胞様細胞の培養”, 第51回日本歯科理工学会学術講演会要旨集, P168 神奈川, 鶴見大学 2008
  12. 赤坂 司, 阿部薫明, 宇尾基弘, 巨理文夫, “単層CNT 透明導電性薄膜上での細胞培養”, 第52回日本歯科理工学会学術講演会要旨集, P392 大阪, 千里ライフサイエンスセンター 2008
  13. Tsukasa Akasaka, Atsuro Yokoyama, Makoto Matsuoka, Takashi Hashimoto, Shigeaki Abe, Motohiro Uo, Fumio Watari, “Human osteosarcoma cell adhesion onto carbon nanotubes sheets”, ISNT abstract, P37, Sapporo, Hokkaido university 2008.
  14. Tsukasa Akasaka, Keiko Nakata, Motohiro Uo, Fumio Watari, “Modification of dentin surface by coating of carbon nanotubes”, ISNT abstract, P64, Sapporo, Hokkaido university 2008.
  15. 赤坂 司, 横山 敦郎, 松岡 真琴, 阿部 薫明, 宇尾 基弘, 巨理 文夫, 佐藤 義倫, 田路 和幸, 橋本 剛, “CNTによる細菌吸着と細胞培養”, 厚労省化学物質リスク研究事業「ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発」H18-化学一般-006 第5回研究成果報告会 抄録集, P20 苫小牧, ホテル ニドム 2009

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案取得  
なし

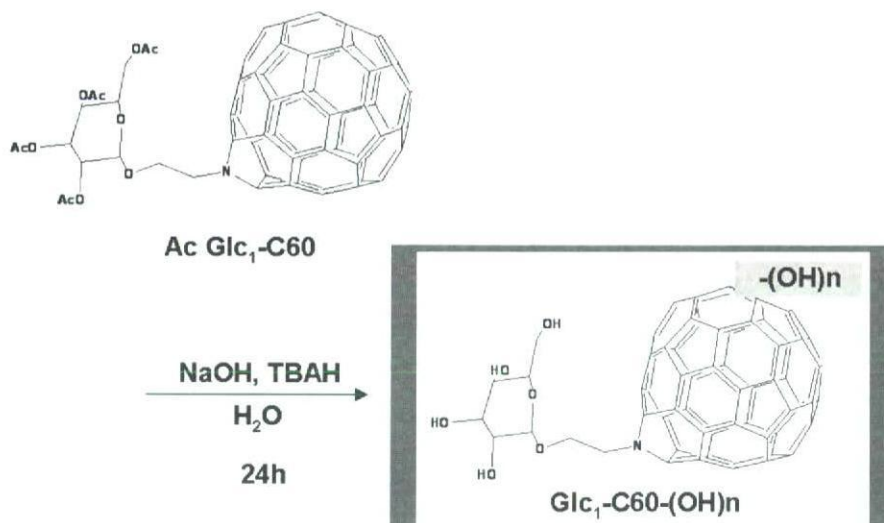


図1 糖鎖結合型水溶性フラーレン合成スキーム (2)



図2 フラーレン誘導体 (凍結乾燥物および水溶液)



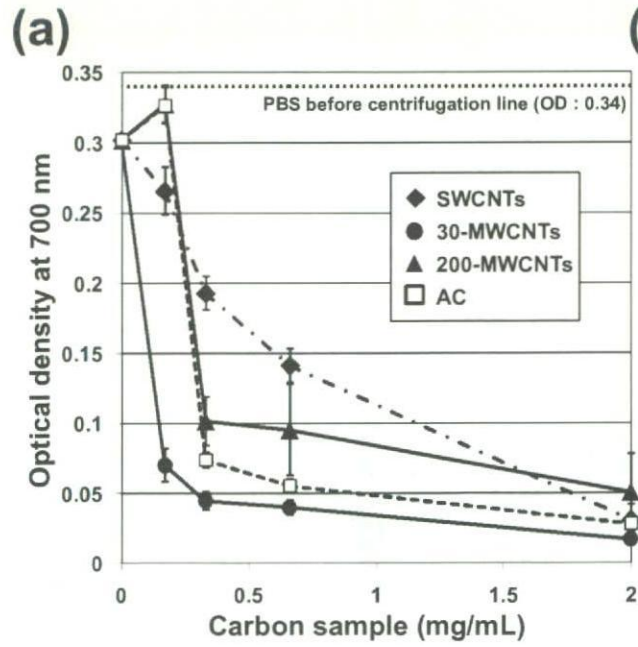


図3 *S. mutans* 懸濁液へのカーボン材料添加による沈降挙動

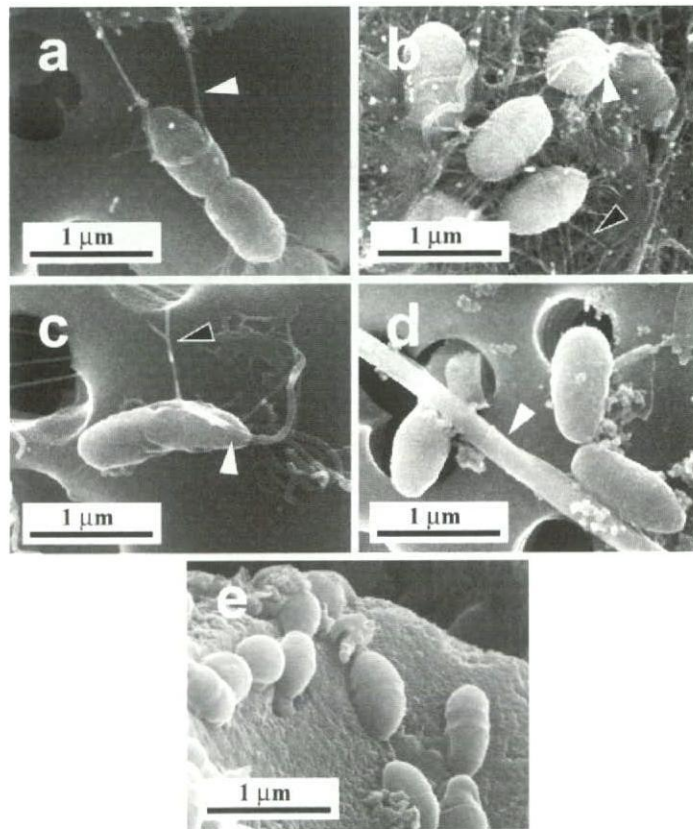
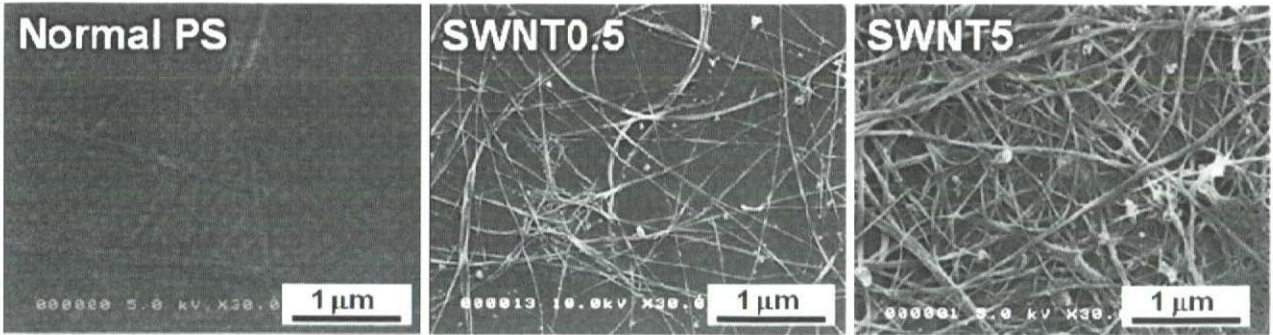


図4 カーボン材料添加後の沈降物のSEM像  
(a, b) SWCNTs、(c) 30-MWNTs、(d) 200-MWNTs、(e) 活性炭



	Normal PS	SWNT0.5	SWNT5
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0	0.5	5
Ra (nm)	$2.2 \pm 0$	$7.1 \pm 0.6$	15.8

図5 CNTコートディッシュ表面のSEM像および表面粗さ(Ra)  
 (左：無処理ポリスチレンディッシュNormal PS、中：SWNT-coated dish ( $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )、  
 右：SWNT-coated dish ( $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ))

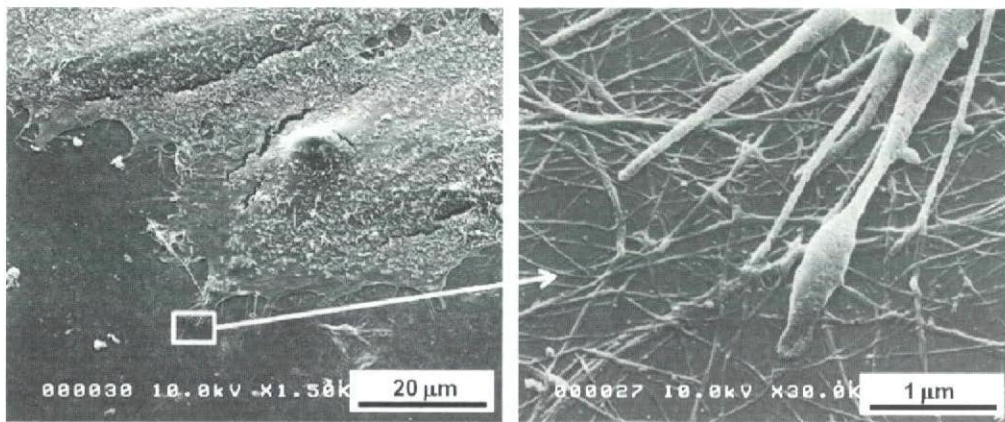


図6 単層CNTコートディッシュ( $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )上でのSaOs-2細胞のSEM像  
 (左：弱拡大像、右：強拡大像)

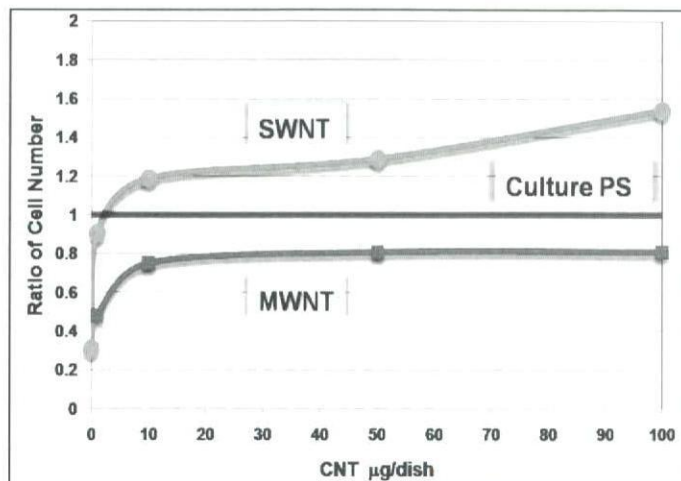


図7 CNTコート量変化によるSaOs-2増殖率変化



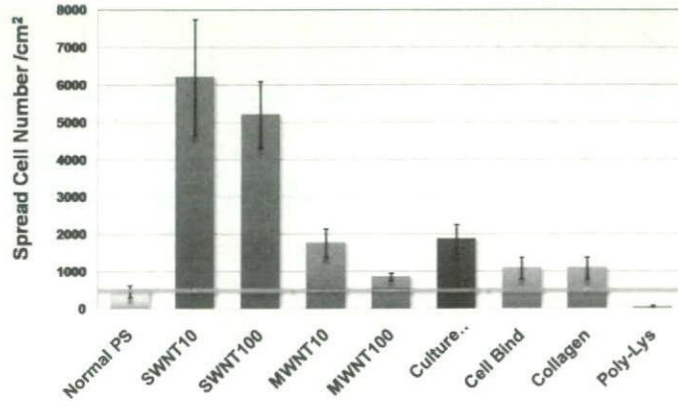


図8 CNT 薄膜における低血清培地での培養

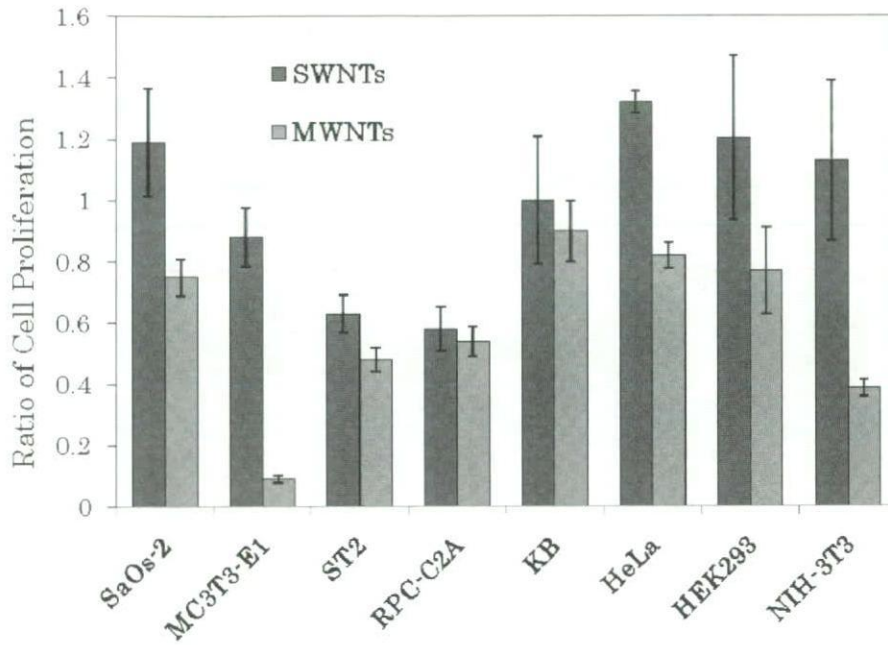


図9 CNT コートディッシュ ( $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 上での各種細胞の増殖率の比較

(\*細胞培養用ポリスチレンディッシュを増殖率を1として比較)

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

ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜と  
BMP を用いた異所性骨形成に関する研究

主任研究者	亙理 文夫	北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者	川浪 雅光	北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者	菅谷 勉	北海道大学大学院歯学研究科准教授
研究協力者	天雲 太一	北海道大学病院保存系歯科医員

研究要旨 本研究では、ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜（nHAC）を精製し BMP による異所性骨形成への有効性を検討した。さらにナノハイドロキシアパタイトの含有量の違いが BMP の活性に影響を与えるかを検討するため、ナノハイドロキシアパタイト（nHAp）の含有量が異なる nHAC 膜を精製し、病理組織学的に比較検討した。まず、nHAC は架橋材を 1%EDC あるいは 0.5mM アスコルビン酸 0.05mM 塩化銅を使用して混合法にて精製、FT-IR、X 線回折および SEM で微細構造を観察した。その結果、両群とも精製した nHAp は結晶サイズがナノサイズであることが確認されたが、アスコルビン酸で架橋した場合は、EDC で架橋した場合に比較して強度が低く、粒子サイズがやや大きかった。次に EDC あるいはアスコルビン酸で架橋した nHAC 膜を 10  $\mu$ g/ml rhBMP-2 を含浸し、ラット背部皮下結合組織及び大腿筋内に移植、1、2 週後に組織学的観察を行った。2 週後には硬組織の形成が認められ、EDC あるいはアスコルビン酸で架橋した nHAC 膜はともに BMP の担体として有効であることが示唆された。

次に、1%EDC を架橋剤とし、添加する CaCl<sub>2</sub> の量を減らしたところ、nHAp 粒子の大きさを変えず、nHAp/コラーゲン比を減らすことができた。次いで、nHAp/コラーゲン比を 70/30、66/34、56/44 に調整した nHAC 膜に 100  $\mu$ g/ml rhBMP-2 を含浸し、ラット背部皮下結合組織に移植、2、4 週後、組織学的観察を行った。2 週後は 70/30 群で、4 週後は 70/30、66/34 群で硬組織の形成が観察された。以上の結果から、ナノハイドロキシアパタイトの含有量が多いほど硬組織形成に有利であることが示唆された。

#### A. 研究目的

現在、歯周病で失われた骨、歯根膜、セメント質を再生する治療法は、いくつか臨床応用されているが、抜歯せざるを得ない進行した歯周病では、機能を回復するほど十分な量の組織が再生できないのが現状である。

我々は bone morphogenetic protein (BMP) を用いて硬組織再生の研究を行ってきたが、これまでの研究成果から、BMP-2 の硬組織誘導作用は直接骨芽細胞を活性化するより、破骨細胞を活性化してカップリングを向上させる作用の方が大きいこと、硬組織の形成と吸収はきわめて近傍で生じること



などから、リン酸カルシウムの濃度が BMP による組織反応に強く影響を及ぼしている可能性があると考えている。

そこで本研究ではナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を使い、ナノハイドロキシアパタイトの含有量の違いが BMP の活性に与える影響を検討する目的で、まずハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を精製し、次に精製したハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜をラット皮下結合組織に移植して組織反応を検討した。

## B. 研究方法

### 1) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の精製と物性及び細胞接着試験

Bradt らの方法<sup>9)</sup>に従い精製した。すなわち、アテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸 1 型コラーゲンを精製し、中性リン酸 buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) を加え、さらに  $\text{CaCl}_2$  を 9mM になるように加え ( $\text{Ca:P}=5:3$ )、37 度で 12 時間インキュベートした。その後、吸引濾過し、1%EDC(1-エチル・3-カルボジイミド塩酸塩)で 1 時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗、凍結乾燥した。また、架橋剤を 0.5mM アスコルビン酸 0.05mM 塩化銅に変えて、同様に 37 度で 12 時間インキュベート、水洗、凍結乾燥を行った。

精製した複合体膜(以下 nHAC 膜)を FT-IR 分析、X 線回折および SEM による微細構造の観察を行った。また、精製した複合体膜表面にヒト骨肉種由来骨芽細胞 Suas2 を  $1 \times 10^5$  個/ml を播種し、3 時間、1、3 日間培養後、ギムザ染色を行って光学顕微鏡下で付着増殖した細胞数をカウントした。

### 2) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜に BMP-2 を含浸させた場合の組織反応の評価

(i) 1) で精製した nHAC 膜を  $4 \times 4\text{mm}$  にトリミングし、phosphate-buffered saline (PBS) にて数回洗浄し、1000U/ml penicillin, 1000  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin 含有 PBS に 24 時間浸漬した。その後、PBS で 0、10  $\mu\text{g/ml}$  に調整した r hBMP-2(R&D)に、10 分間浸漬した。

#### (ii) 手術方法

動物実験は 8 週齢のウィスター系雄性ラットを用

いた。なお、本実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を経て同ガイドラインに従って行った。ラットにペントバルビタール(ソムノペンチル®共立製薬株式会社)の腹腔内投与( $7.0 \times 10^{-4}\text{ml/}$ 体重 g)による全身麻酔を行い、背部皮下結合組織内及び大腿筋内に BMP-2 を含浸させた nHAC 膜を移植した。

#### (iii) 病理組織学的観察

1、2 週の観察期間後に、移植 nHAC 膜と周辺組織を一塊として摘出し、10%ホルマリン (pH7.4) にて固定、10%EDTA(pH7.0)にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、厚さ 5  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製し、ヘマトキシレン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。

### 3) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン比の異なる nHAC 複合体膜の精製

2) の結果から、1) と同様にアテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸 1 型コラーゲンを精製し、Ca:P 比が 5:3 になるように中性リン酸 buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (9, 6.75, 4.5mmol/l) と、 $\text{CaCl}_2$  (5.4, 4.05, 2.7mmol/l) をそれぞれ加え 37 度で 12 時間インキュベートした。その後、吸引濾過し、1%EDC で 1 時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗、凍結乾燥した。その後、精製膜を 700°C で焼却することで、ハイドロキシアパタイト/コラーゲンの比率を割り出した。また X 線回折、FT-IR 分析および SEM にて微細構造を観察した。

### 4) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン比の異なる nHAC 複合体膜に BMP-2 を含浸させた場合の組織反応の評価

(i) 3) で精製した nHAC 膜を  $4 \times 4\text{mm}$  にトリミングし、phosphate-buffered saline (PBS) にて数回洗浄し、1000U/ml penicillin, 1000  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin 含有 PBS に 24 時間浸漬した。その後、100  $\mu\text{g/ml}$  に調整した r hBMP-2(R&D)に、10 分間浸漬した。

#### (ii) 手術方法

8 週齢のウィスター系雄性ラットを用いて、2(ii)と同様に背部皮下結合組織内 BMP-2 を含浸させた nHAC 膜を移植した。

#### (iii) 病理組織学的観察



2,4週の観察期間後に、移植nHAC膜と周辺組織を一塊として摘出し、10%ホルマリン(pH7.4)にて固定、10%EDTA(pH7.0)にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、厚さ5 $\mu$ mの連続切片を作製し、ヘマトキシレン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。

## C. 研究結果

### 1) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のFT-IR分析、X線回折、細胞接着試験及びSEM観察

1%EDCで架橋したnHAC膜(図1)のX線回折ではナノハイドロキシアパタイトと類似したパターンを示していた(図2a)。FT-IR分析ではアミド1とP-Oにピークが認められた(図3)。SEM観察では膜全面に均一なナノサイズのハイドロキシアパタイト粒子が観察され、コラーゲン線維はほとんど露出していなかった(図4a,b)。細胞接着試験では付着細胞数は経時的に増加を示した(図5)。

一方、0.5mMアスコルビン酸 0.05mM塩化銅で架橋した複合体膜においてもX線回折のパターンはハイドロキシアパタイトと類似したパターンをしめした(図2b)。FT-IR分析ではアミド1とP-Oにピークが認められた(図3)。SEM観察では均一な結晶粒子が散在し、コラーゲン線維の露出が多く観察され、結晶のサイズもEDC架橋に比較すると大きかった(図6)。

### 2) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜にBMP-2を含浸させた場合の組織反応

#### (i) 大腿筋内

1週では1%EDCで架橋したnHAC膜のBMP群、PBS群ともに、数片に分解され、複合体膜周辺にはリンパ球を主体とする炎症性細胞が観察された。硬組織の形成は観察されなかった。0.5mMアスコルビン酸 0.05mM塩化銅で架橋したnHAC膜のBMP群では、複合体膜周辺を一部囲むように一層の硬組織の形成が観察された。リンパ球の浸潤は1%EDCで架橋したnHAC膜よりも少ない傾向を示した。PBS群では、nHAC膜は数片に分解され、複合体膜

周辺にはリンパ球を主体とする炎症性細胞がみられ、硬組織の形成は観察されなかった。

2週では、1%EDCで架橋したnHAC膜のBMP群では不定形の硬組織の形成が広範囲に確認され、複合体膜周辺には骨芽細胞様細胞が観察された(図6a)。PBS群では硬組織の形成は観察されず、分解片周辺のリンパ球は1週と比較して減少していた。0.5mMアスコルビン酸 0.05mM塩化銅で架橋したnHAC膜のBMP群では、一部に不定形の染色性の低い無構造な組織が分解片間で観察された(図6b)。PBS群では硬組織の形成は観察されず、分解片周辺のリンパ球は1週と比較して減少していた。2週においてもリンパ球の浸潤はEDCで架橋したnHAC膜の方が多く観察された。

#### (ii) 背部皮下

1週では1%EDCで架橋したnHAC膜のBMP群、PBS群ともに数片に分解され、周辺にはリンパ球を主体とする炎症性細胞が観察され、硬組織の形成はなかった。0.5mMアスコルビン酸 0.05mM塩化銅で架橋したnHAC膜でも、BMP群、PBS群ともに同様な組織像で硬組織形成はみられなかった。アスコルビン酸塩化銅で架橋したnHAC膜はEDC架橋より炎症性細胞浸潤は少なかった。

2週では、1%EDCで架橋したnHAC膜のBMP群では、一部に不定形の染色性の低い無構造な組織が観察された(図7a)。PBS群では硬組織の形成は観察されず、膜周辺のリンパ球は1週と比較して減少し、結合組織の層が観察された。0.5mMアスコルビン酸 0.05mM塩化銅で架橋したnHAC膜のBMP群では、不定形の硬組織の形成が確認され、周辺には骨芽細胞様細胞が観察された(図7b)。PBS群では硬組織の形成は観察されず、分解された膜周辺のリンパ球は1週と比較して減少していた。

### 3) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン比の異なるnHAC複合体膜のX線解析及びSEM観察

700°Cで焼却した結果、リン酸緩衝溶液および、CaCl<sub>2</sub>の添加量を減らすことでナノハイドロキシアパタイト/コラーゲン比が70/30、66/34、56/44とナノハイドロキシアパタイトの含有量が減少することが認められた(表1)



X線回析では回析パターンがハイドロキシアパタイトと類似したパターンを示していた(図8)。FT-IR分析ではアミド1とP-Oにピークが認められた(図9)。SEM観察では均一なナノハイドロキシアパタイト粒子が散在し、コラーゲンの露出が多く観察された(図10a,b,c)。

4) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン比の異なるnHAC複合体膜にBMP-2を含浸させた場合の組織反応

2週では、70HA/30CG群ではnHACは小片に分解され、その周囲に硬組織の形成が広範囲に確認され、骨芽細胞様細胞や多核巨細胞が観察された。硬組織とnHACの境界は不明瞭であった。66HA/34CG、56HA/44CG群ではともにnHACは小片に分解され硬組織の形成は観察されなかった。

周囲にはリンパ球を主体とする炎症性細胞とわずかに多核巨細胞の浸潤が認められた。

4週では、70HA/30CG群ではnHACはほとんど観察されず、骨髄様構造を呈した骨形成に置換されていることが確認された(図11a)。66HA/34CG群ではnHACが小片に分解され周囲に硬組織の形成が確認され、骨芽細胞様細胞及び多核巨細胞が観察された(図11b)。硬組織とnHACの境界は不明瞭であった。56HA/44CG群ではnHACは小片に分解され硬組織の形成は観察されなかった。周囲は結合組織で被覆され、線維芽細胞様細胞の浸潤が観察された(図11c)。

#### D. 考察

コラーゲンの架橋としてはホルムアルデヒドなど多数あるが、残留した架橋剤の生体毒性が問題となることがある。今回使用したEDC架橋剤は水に可溶なため、反応終了後に抽出操作によって生成物との分離が可能であること、アレルギー反応が起こしにくく、化粧品や生体内分解吸収性医療用材料として使用されており、生体毒性の危険性は低いと考え使用した。EDC架橋ではリン酸カルシウムの粒子サイズをナノレベルまで小さくすることがSEMで確認できた。一方で、X線回析のパターンがハイドロキシアパタイトと類似していたことから、本研究で合成したリン酸カルシウムはハイドロキシアパタイト

と判断した。

一方で、架橋剤を0.5mMアスコルビン酸0.05mM塩化銅は生体内に存在している物質であり、生体為害性はなく、さらにアスコルビン酸は硬組織の形成にも有利に作用することから架橋剤として選択した。アスコルビン酸で架橋した場合、X線回析のパターンはハイドロキシアパタイトと類似しており、EDCを用いた場合と同様にハイドロキシアパタイトと判断した。しかし、SEM観察からリン酸カルシウムの結晶サイズは若干大きく、コラーゲンに対しまばらに散在していることが観察された。ハイドロキシアパタイトを混合法で精製する場合、pHによって粒子サイズ、形態が異なることが報告されており、EDC架橋ではpH7.4であるのに対し、アスコルビン酸のpHは2.8と低いことから精製したハイドロキシアパタイトと反応し、粒子サイズの大きなリン酸カルシウム-コラーゲン複合体になったと考えられる。また、アスコルビン酸で架橋した場合、EDCと比較して強度が低かった。このことからアスコルビン酸がEDCと比較して架橋作用が弱いことが示唆された。

生体内に移植した場合、PBSを浸潤させた群では、1週、2週ともに硬組織の形成は確認されなかったのに対し、rhBMP-2を浸潤させた群では、2週目において架橋剤によらず、硬組織の形成が確認された。また、架橋剤を1%EDCと0.5mMアスコルビン酸0.05mM塩化銅で比較した場合、1%EDCで架橋した群では、筋ではより広範囲に硬組織の形成が観察されたが、皮下結合組織ではむしろアスコルビン酸塩化銅で架橋した膜の方が硬組織形成は多かった。したがって、いずれの架橋剤を用いても、BMPの担体として有効であるが、最適な担体は組織によって異なる可能性があると思われた。

以上の結果から、ナノハイドロキシアパタイトの含有量の異なるナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を作製するためには、移植直後の炎症性細胞浸潤はやや高いものの、EDCを架橋剤として用いた方が適切であると考えられた。そこでナノハイドロキシアパタイトの含有量を減少させた複合体膜を作製した。作製した複合体膜を700℃で焼却した結果、ハイドロキシアパタイト/コラーゲン比が70/30、66/34、56/44と、ナノハイドロキシアパタイトの含有量が減少することができた。また、X線回



析及び、FTIR のパターンはハイドロキシアパタイトと類似していたことから、添加するリン酸緩衝溶液及びCaCl<sub>2</sub>の量を減らすことで、ナノハイドロキシアパタイト粒子の大きさを変えず、量のみを減らすことができることが明らかとなり、BMP の活性にリン酸カルシウムの含有量が及ぼす影響を検討するには、有効な材料と考えられた。

病理組織学的観察からはハイドロキシアパタイトの含有量が多いほど、早期に新生骨が形成されていた。その理由として、一つはBMP-2はコラーゲンよりもハイドロキシアパタイトに吸着しやすいこと、もう一つはカップリング作用の亢進が考えられた。すなわち、BMP が直接骨芽細胞に分化誘導だけでなく、複合体膜の周辺には多核巨細胞が観察されていたことから、BMP-2が破骨細胞を活性化してnHACを吸収分解することで、Caの局所濃度が上昇したことで、カップリング反応から骨芽細胞を活性化した可能性が考えられた。一方、形成された硬組織は分解された複合体膜の周囲に直接形成されており、その境界は不明瞭であった。このことから複合体膜が核となって新生骨に置換、形成された可能性もある。しかし、移植したnHACが吸収されるのか、核となって新生骨に取り込まれるのかなど、詳しいメカニズムについては今後の研究が必要である。

## E. 結論

ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜はBMPの担体として有効であり、ナノハイドロキシアパタイトの含有量が多いほどBMPの活性が高くなることが明らかとなった。

## 研究発表

### 1. 研究会発表

1. 天雲太一、田中陽、菅谷勉、福田寛恵、川浪雅光、赤坂司、亘理文夫、“歯根象牙質表面への bone morphogenetic protein2(BMP2)塗布による硬組織形成と象牙質吸収”第4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、P26、東京都、江戸川区 2007
2. 天雲太一、菅谷勉、田中陽、福田寛恵、川浪雅光、宇尾基弘、赤坂司、亘理文夫、“ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜とBMPによる硬組織誘導”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、P22、北海道、登別市 2007

3.天雲太一、田中陽、菅谷勉、川浪雅光、赤坂司、亘理文夫、“ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜とBMPによる硬組織誘導”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、P15、愛知県、名古屋市 2007

4. 天雲太一、菅谷 勉、田中陽、福田寛恵、川浪雅光宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫、“ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のBMP担体としての有効性”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、北海道、苫小牧市 2008

5.Taichi Tenkumo, Tsutomu Sugaya, Akira Tanaka, Hiroki Tamagawa, Masamitsu Kawanami, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, “The effect of nanohydroxyapatite-collagen composite foil by BMP-2 application” International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application 北海道、札幌市、2008

6. 天雲太一、菅谷勉、川浪雅光、亘理文夫、“rhBMP-2に関するハイドロキシアパタイト含有量の違いによる影響の研究”第21回代用臓器再生医学研究会総会、北海道、札幌市、2009

4. 天雲太一、菅谷 勉、田中陽、川浪雅光、宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫、“ハイドロキシアパタイト含有量の異なるナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のBMP担体としての有効性”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5回研究成果発表会要旨集、北海道、苫小牧市 2009

## 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