

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

カーボンナノ物質に対する生体反応

－生体材料への応用と生体内分布－

分担研究者	横山敦郎	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	平田恵理	北海道大学歯学研究科大学院生
研究協力者	山本 悟	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	野田坂佳伸	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	笠井孝夫	北海道大学歯学研究科大学院生
研究協力者	坂口紀史	北海道大学エネルギー変換 マテリアル研究センター准教授
研究協力者	菫澤 崇	ブルカー・ダルトニクス株式会社

研究要旨 我々の研究の最終的な目的は、カーボンナノチューブ(CNTs)をはじめとするカーボンナノ物質の生体材料への応用である。本研究においては、カーボンナノ物質に対する生体反応の解明を目的として研究を行った。生体反応として、各種カーボンナノ物質の皮下組織への埋入後の組織学的、超微細構造学的検索およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析を用いた静注後の水溶化フラーレンの体内分布の解析を行なった。実験動物としてラットを用いた長期埋入試験の結果、従来生体内では構造変化が生じないと考えられていた多層カーボンナノチューブも1年以上長期埋入により、外層の結晶構造に変化が生じることが明らかとなった。しかし、2年間埋入後も、腫瘍などの変化は認められなかった。水溶化フラーレンは静注1時間後では、脳、肺、肝、腎、脾臓のいずれの組織でも検出されなかったが、24時間後肝臓で検出されたが、脳、肺、脾臓では検出されなかった。以上の結果から、カーボンナノ物質の体内における安全性と生体材料としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

最近、ES細胞やiPS細胞など再生医学に関する研究が著しく発展し、国民の再生医療への期待が高まっている。新しい方法や技術に基づく再生医療や遺伝子治療などの治療法の開発は、超高齢化社会が到来し、生活習慣病の危険が増加しつつある現在、国民の健康の保持に重要であるとともに、増大する医療費の抑制にも大きく貢献するものと思われる。特に、新たなる戦略による生体材料の開発は医学のみならず広く科学全体の発展に寄与するばかりでなく、周辺産業の育成にも大きく貢献するこ

とが期待されている。

一方、工業的に非常に優れた材料としてこれまでに多くの建築物等に使用されてきたアスベストの被曝長期間経過後に生じる中皮腫等の問題が、最近報道され、材料の生体に対する安全性が大きな社会問題になっている。

我々は、このような状況を鑑み、物理的、化学的、電気的特性から多くの分野で基礎的な研究がなされているカーボンナノ物質を医学・歯学領域に応用することを目的に、カーボンナノ物質を応用した生体材料の開発とともにカーボンナノ物質の生体に対す

る安全性について数年来研究を行っている。昨年来、海外の著名な科学雑誌をはじめとして、ナノ物質の環境汚染や生体に対する為害性が報告されているが、一方為害性は少ないという報告もなされており、その解明が期待されている。

我々の研究の最終的な目的は、カーボンナノチューブ(CNTs)をはじめとするカーボンナノ物質の生体材料への応用である。本研究においては、カーボンナノ物質の生体反応の解明について研究を行った。アスベストが生体内に取り込まれた後、十数年以上という長期間経過して多くの問題を惹起したことを考慮し、長期間埋入時のカーボンナノ物質の生体反応を組織学的、超微細構造学的に検索するとともに、生体材料への応用を考慮し多層カーボンナノチューブをコーティングしたコラーゲンスポンジの皮下への埋入、さらにカーボンナノ物質が生体内に取り込まれた場合の体内での分散、蓄積および排出を明らかにするために、水溶化フラーレン静注後の生体内分布をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析で分析した。

B. 研究方法

1. カーボンナノ物質のラット皮下への埋入試験

1) 材料

(1) 多層カーボンナノチューブ (MWCNTs)

Nano Lab 社製 MWCNTs の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 μm の濾過膜で濾過し、平均長さ 220nm および 825nm の MWCNTs を得た(以下 220MWCNTs および 825MWCNTs とする)。 (図1)

(2) 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。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 μm 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)。 (図2)

2) 実験方法

6 週齢雄性ウィ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、粉状の H-CNFs および MWCNTs を埋入し、縫合した。(図3) 埋入 1 および 2 年後に Pentobarbital Sodium による全身麻酔後、グルタルアルデヒドによる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、グルタルアルデヒドにて浸漬固定後 2 分割し、一方は、パラフィンに包埋し、光学顕微鏡用の標本を作製した。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、透過型電子顕微鏡(日立 H800, H700) および高分解能透過型電子顕微鏡(日立 H-7650 および日立 H-9500)、さらに超高分解能電子顕微鏡(日本電子 JEM-ARM-1300)にて観察した。

2. 多層カーボンナノチューブをコーティングしたコラーゲンスポンジのラット皮下への埋入実験

1) 材料

精製・親水化処理した多層カーボンナノチューブ(MWCNTs:直径 20~50nm, CNT Inc., Korea)を界面活性剤水溶液(コール酸ナトリウム:0.1w/v%)に 100ppm になるよう分散させた。同分散液中にコラーゲンスポンジ(3x3x2mm; AteloCell[®]; Koken Co., Ltd)を浸漬し、数時間振とうさせた後、洗浄し多層カーボンナノチューブコートスポンジを作製した。

2) 実験方法

6 週齢雄性ウィ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、多層カーボンナノチューブコートスポンジを埋入した。対照としてコラーゲンスポンジのみを埋入し、術後 1 および 4 週で試料を周囲組織とともに摘出し、パラフィン包埋を行った後、厚さ 5 μm に薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。

3. カーボンナノ物質の細胞培養用スキャホールドへの応用

1) 材料

(1) MWCNTs

直径5–20nm, 長さ20–40 μ mのNano Lab社製MWCNTs(純度98.17%)を, 塩酸により触媒を除去し, 実験に用いた.

(2) 単層カーボンナノチューブ(SWCNTs)

直径1.3–1.5nm, 長さ2–3 μ mのNano Lab社製SWCNTs(純度99.56%)を, 塩酸により触媒を除去し, 実験に用いた.

(3) グラファイト(GP)

直径4.5 μ mのグラファイト粒子を実験に用いた.

2) 実験方法

(1) 細胞培養用スキャホールドの作製

MWCNTs, SWCNTs および GP 各200 μ gを100mlの脱イオン水に, 分散させ15分超音波処理を行った. その後, 分散液を直径47mm, 孔径0.8 μ mのPC膜を用いて吸引ろ過し, PC膜を60 $^{\circ}$ C, 30分乾燥し, MWCNTs, SWCNTs および GP をPC膜に固着し, スキャホールドを作製した. (図3)

(2) タンパク吸着試験

各スキャホールドを, 10%FBSを含むDMEM培地(2ml)に37 $^{\circ}$ C, 24時間浸漬した. スキャホールドをPBSで3回洗浄した後, 15分間超音波処理を行い, 1200rpmで3分間遠心し, 上澄を回収し, BCA法でタンパク量を計測した.

(3) 細胞培養

各種スキャホールドを6cmディッシュに固定し, ヒト骨肉種由来の骨芽細胞様細胞であるSaOS2を 1×10^5 個播種し, 10%FBS および抗生剤を含むDMEM培地で, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂気相下で3日および7日培養した.

(4) 細胞増殖試験

各スキャホールドの細胞の増殖に対する影響を検索するため, 上記の培養条件で3および7日間培養し, SEM写真を撮影し, 任意の10領域の細胞数を測定した.

(5) アルカリフォスファターゼ活性

各スキャホールドの骨芽細胞の機能に対する影響を検索するため, 3および7日間培養後のアルカリフォスファターゼ活性を測定した.

(6) 検定方法

タンパク吸着, 細胞数, アルカリフォスファター

ゼ活性の測定結果については, Mann-Whitney U検定にて, 有意差検定を行った.

3. フラーレンの生体内分布の検索

1) 材料

(1) 水溶化フラーレンの調整

体内におけるフラーレンの分布を検索するため, フラーレンに水酸基を多数導入し, 水溶化フラーレンを調整した.

2) 実験方法

(1) フラーレン検出確認のための予備実験

6週齢雄性ウィスター系ラットを実験動物として用いた. エーテル吸入にて屠殺後, 肝臓を摘出し, 約5mm角に切り出した後, 水溶化フラーレンを1ml注入した. 液体窒素にて凍結後, 凍結切片を作製し, 凍結乾燥後, マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)により, フラーレンを検出した.

(2) 静注後のフラーレンの生体内分布について

6週齢ウィスター系雄性ラットを実験動物として用いた. 凍結乾燥した水溶化フラーレンを生理食塩水に3mg/mlの濃度に溶解し, エーテルおよびPentobarbital Sodiumの腹腔内注射による全身麻酔下でラット尾静脈より1ml注入した. 注入後1および24時間後に, エーテルの過量吸入によりラットを安楽死後, 脳, 肺, 肝臓, 脾臓および腎臓を摘出した. 摘出した試料を液体窒素にて凍結し, 凍結切片を作製し, 凍結乾燥後MALDI-TOF-MSにより分析した. サンプル調整条件としては, 各組織, コントロール(注射用蒸留水)およびフラーレン投与群を同時に測定した. イメージの描写は, シグナルの強度を指定してすべて同じ条件で行った. 測定条件は, 印加電圧加速電圧19kV, 反射電圧21kV, 測定モードはPos Reflector modeとした. 凍結切片の一部については, 通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を行い, 光学顕微鏡にて観察した.

尚, 最終年度にも同様の実験を異なる方法で水溶化したフラーレンを用いて行った.

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は, 北海道大学動物実験委員会の承認を得て, 北海道大学動物実験に関する指針に基づき行った.

C. 研究結果

1. カーボンナノ物質のラット皮下への埋入試験

1) MWCNTsについて

(1)220MWCNTs :

埋入1週間においては、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が(図4-1)、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(図4-2)。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。

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、強い炎症反応は認められなかった(図4-3)。TEM観察においては、1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(図4-4)。

1年後においては、220MWCNTsは、脂肪組織内に観察された。小さな220MWCNTsの集塊は、マクロファージに貪食されていたが、大きな集塊の周囲には異物巨細胞が観察され、軽度ではあるが、いわゆる肉芽腫性炎を呈していた(図4-5, 6)。TEM像においては、マクロファージ内のほとんどの220MWCNTsは、ライソゾーム内に観察された。チューブ状の特有な構造には変化が見られなかった(図4-7)。

2年後においては、220MWCNTsは、組織内で大きな凝集塊として観察され、薄層の線維性結合組織が認められた(図4-8)。凝集塊表面には、異物巨細胞が観察されたが、肉芽腫性炎の状態は呈していなかった(図4-9)。TEM観察においては、凝集の程度は弱くなる傾向を示し、1本1本の構造が明確に観察されるようになった(図4-10)。

(2)825MWCNTsについて

埋入1週間後、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と比較すると炎症反応はやや強い傾向を示した(図4-11)。825MWCNTsの一部は、マクロファージに貪食されていた。TEMでは、細胞間の一部に

825MWCNTsが観察されたが(図4-12)、マクロファージの細胞質内にも凝集したCNTsが認められ、膜構造で覆われていないものが多かった(図4-13)。高分解能TEM観察では、MWCNTsの層状の構造が明瞭に観察された(図4-14)。

埋入16週間後では、825MWCNTs周囲には、マクロファージや異物巨細胞に認められ、マクロファージや線維芽細胞内に貪食されている像も観察された(図4-15)。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(図4-16)。TEMにおいては、ライソゾームに存在する825MWCNTsも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(図4-17)。

1年後においては、825MWCNTsは、脂肪組織内に観察された。軽度な肉芽腫性炎を呈していた。16週までは、220MWCNTsより炎症反応は強い傾向を示したが、1年後においては、差は認められなかった(図4-18, 19)。TEM観察においては、チューブ状の構造には変化が見られなかったが、凝集の程度は弱くなる傾向が認められ、1本1本のMWCNTsの構造が明確に観察された(図4-20)。一方、超高压超高分解能TEM観察においては、層状構造に劣化を示す像が観察された(図4-21)。

2年後においては、MWCNTsの集塊は薄層の線維性結合組織に被包されていた(図4-22)。強拡大像においては、比較的小さなMWCNTs集塊は、マクロファージに貪食されており、大きなMWCNTs集塊表面には異物巨細胞が観察された(図4-23)。TEM観察においては、1年後と比較し、さらに凝集程度が低くなる傾向を示したが、チューブ状の構造には変化が認められなかった。高分解能TEMにおいては、MWCNTsの外層が1週間後と比較し、肥厚する傾向を示し(図4-24)、さらに最外層のMWCNTsには、構造の変化が観察され、1週間後と比較すると層状構造が不明瞭になっていた(図4-25)。

2) H-CNFsについて

(1)600H-CNFs :

埋入1週間後においては、大きな集塊のH-CNFsは、線維性結合組織に被包されていたが、H-CNFsの多く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(図5-1). 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(図5-2). 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, その周囲は極薄い線維性結合組織の被膜に覆われているに過ぎなかった. 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(図5-3). 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の変化が示唆されるものも観察された(図5-4).

埋入1年後において, H-CNFsは, 脂肪組織内に観察された. 16週と同様に, 小さなH-CNFsの集塊は, マクロファージ等の貪食細胞内に観察されたが, 大きな集塊は薄い線維性結合組織に被包されていた(図5-5). TEM 観察においては, 長さの短いH-CNFsや特徴である傘が積層された結晶構造の変化を示唆する像がライソゾーム中に認められた(図5-6).

埋入2年後においては, HCNFsは, 線維性結合組織の中に観察され, 周囲には炎症性の細胞はほとんど観察されなかった(図5-7)が, 一部にはHCNFsを貪食しているマクロファージが毛細血管近傍に観察された(図5-8). 高分解能TEM 観察においては, 1週では明瞭に観察された, グラフェンシートのエッジが不明瞭となり(図5-9), 層状の構造も不明確となっているものも観察された(図5-10).

2)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(図5-11). 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(図5-12). 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(図5-13). 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(図5-14).

1年後においては, H-CNFsは脂肪組織中に観察された. 600H-CNFsとほぼ同様な組織像を示し, 初期に観察された材料の長さによる炎症反応の強さの差は認められなかった(図5-15). TEM 観察においては, 特有な結晶構造である積層された傘が分離し, 短縮を示唆する像が認められた(図5-16).

2. 多層カーボンナノチューブをコーティングしたコラーゲンスポンジのラット皮下への埋入実験

1) コラーゲンスポンジ

埋入1週後においては, コラーゲンスポンジは幼弱な肉芽組織で被包されていた(図6-1). 辺縁部のポア内には, 毛細血管や線維芽細胞が多数観察され, コラーゲン表面に多角異物巨細胞も観察された(図6-2). 4週後では, コラーゲンスポンジは, 吸収され, 皮下組織には認められなかった.

2) 多層カーボンナノチューブコートスポンジ

埋入1週後においては, コラーゲンスポンジと同様に幼弱な肉芽組織で覆われていた(図6-3). 多層カーボンナノチューブの一部は, コラーゲンスポンジから剥離し, マクロファージに貪食されていた(図6-4). ポア内には, 線維芽細胞とともに多くのマクロファージが観察された. 炎症反応は, コラーゲンスポンジに比較しやや強い傾向を示した.

埋入4週後においては, 多層カーボンナノチューブコートスポンジは, 線維性結合組織に被覆されていた(図6-5). コラーゲンスポンジは, 観察されず, 多層カーボンナノチューブが線維や線維芽細胞の間に, 規則性のある形で認められた. 多くの多層カーボンナノチューブは, マクロファージに貪食されていた(図6-6).

3. カーボンナノ物質の細胞培養用スキャホールドへの応用

1) 細胞培養用スキャホールドの作製

いずれのカーボンナノ物質もPC膜に十分に固着され, 培地中で剥離することはなかった.

2) タンパク吸着試験

図7-1にタンパク吸着試験の結果を示す. SWCNTsが最も高い値を示し, 以下MWCNTs, PC,

GP の順であった。

3) 細胞増殖試験

培養3日後および7日後の各スキャホールド上で
の形態を図7-2に、細胞数を、図7-3に示す。

3, 7日後とも、PCに比較しCNTsは細胞数が有意
に多く、また7日後では、SWCNTsのほうが
MWCNTsに比較し有意に多い値を示した。

4) アルカリフォスファターゼ活性

培養3日後および7日後のALP活性を図7-4
および7-5に示す。スキャホールドあたりのALP
活性、タンパク量あたりのALP活性ともに、PC、
GPに比較しCNTsのほうが高い値を示した。

4. フラーレンの生体内分布の検索

(1) 予備実験について

MALDI-TOF-MSの結果を図に示す。今回の検索
では、肝臓におけるフラレンの局在が明確に示さ
れた(図8-1, 2)。

(2) 静注後のフラレンの生体内分布について

静注後1時間の脳のマALDI-TOF-MSのマッピン
グ像とサムスペクトルを図に示す(図8-3)。左が
マッピング像、右がサムスペクトルである。それぞ
れ上段がコントロールである生理食塩水を静注し
たものであり、下段が水溶性フラレンを静注した
ものである。ともに、マッピング像でフラレンは検
出されず、サムスペクトルにおいても720にピーク
は検出されていない。

図(図8-4)に静注後1時間の肝臓の
MALDI-TOF-MSのマッピング像とサムスペクトル
を示す。上段が生理食塩水、下段がフラレンであ
る。マッピング像においてフラレンが検出され、
サムスペクトルにおいても720に強いピークが検出
されている。図8-5は、凍結切片のヘマトキシリ
ンエオジン染色をした光顕像である。左が生食、右
がフラレンであり、特に変化は認められない。

図(図8-6)は、静注後1時間の腎臓の
MALDI-TOF-MSのマッピング像とサムスペクトル
である。切片全体としては、検出されないが、下段
の図において、一部の点では、サムスペクトルにお
いて720のピークが検出されている。

1時間後の切片では、他の脳や脾臓には検出され
なかった。

静注24時間後の肝臓のマALDI-TOF-MSのマッピン

グ像とサムスペクトルを示す(図8-7)。コントロ
ール、フラレン静注ともにフラレンは検出され
なかった。

図8-8に静注24時間後の脳のマALDI-TOF-MS
のマッピング像とサムスペクトルを示す。フラレン
静注したもののマッピング像にわずかに強度の異
なる部分が認められるが、サムスペクトルではピー
クは検出されなかった。他の腎臓、肺および脾臓に
は検出されなかった。

*異なる方法で水溶化したフラレンの生体内分布
について

静注1時間後の脳、肺、肝臓のマALDI-Imaging
を図8-9, 10に示す。上段が水溶性フラレン
を静注したものの、下段がコントロールである蒸留水
を静注したものである。すべての像においてフラ
レンは検出されていない。静注24時間後の
MALDI-Imagingを図8-11に示す。脳、肺、腎臓
には1時間後と同様にフラレンは検出されていな
い。図8-12に、24時間後の肝臓のマッピング像
とスペクトルを示す。マッピング像においてフラ
レンが検出され、スペクトルにおいても720に強い
ピークが検出されている。

.....

D. 考察

1. カーボンナノ物質のラット皮下への埋入試験

本研究では、カーボンナノ物質の生体に与える影
響について、*in vivo*の実験系を用いて検索した。
さらに、カーボンナノ物質の構造とサイズが生体反
応にどのような影響を与えるのかについても検討し
た。

埋入1年後以降においては、MWCNTsのサイズ
による炎症の程度に差は認められなかった。サイ
ズによる炎症程度の差には、MWCNTsの凝集が
関係していると推察される。TEM所見から、
220MWCNTsが1週後からライソゾーム内に認めら
れるのに対し、825MWCNTsでは、細胞間に存在す
るものが多く、細胞内においても細胞質内で凝集し
て存在しているものが多いことから、長いMWCNTs
のほうが、マクロファージで処理されにくいことが
示唆された。これは、本研究グループの共同研究者
である佐藤が報告しているように、長いMWCNTs

の凝集性のほうが強く、さらに825MWCNTsは湾曲が強い形であり、凝集した状態から分離しにくいことなどに起因するものと推察された。16週においては、220MWCNTsに比較するとその数は少ないが、825MWCNTsにおいても一部にライソゾーム内にMWCNTsが観察された。さらに1年後においては、凝集の程度は弱くなり、MWCNTsの1本1本の構造が明瞭に観察されるものも認められた。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、1年後825MWCNTsにおいても凝集が弱くなったことから、炎症の程度に差異が認められなくなったものと推察された。

MWCNTsでは、切断、短縮などの変化は認められず、チューブ状の構造が埋入1年後においても維持されていた。しかし、高分解能TEMによる観察では、MWCNTsの外層の肥厚が観察され、最外層の層状構造が不明瞭になっていることが明らかになった。超高压超高分解能TEMにおいても、層状構造の劣化が認められた。このような高分解能TEM観察から、MWCNTsにおいても結晶構造の変化が生じることが示唆された。Sp²構造は安定とされているが、長期間体内に埋入されている状態では、マクロファージ等の細胞の影響を受け、構造の変化が生じるものと推察された。

H-CNFsについては、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種を試料として用いたが、長い1200H-CNFsの炎症反応のほうが、埋入初期においては600H-CNFsに比較し強い傾向を示したが、1年後においてはMWCNTsの場合と同様に差はほとんど観察されなかった。初期の炎症程度の差違の原因として、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、600H-CNFsは、埋入1週においてライソゾーム中に認められるものがあり、多くのH-CNFsが、細胞質内において円形に集合していた。このことから、マクロファージ内でCNFsの処理が1週においてすでに進行していることが推察される。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が示された。このため、埋入1年後といった長期においては、炎症程度には差が認められなかったと推察された。マクロファージ内でのH-CNFsの処理には、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可能性が示唆された。H-CNFsは、傘状のグラフェンシートが積層された構造をしており、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2年後の高分解能TEM観察において、グラフェンシートのエッジの不明瞭化が認められた。これは、埋入1週後においては観察されず、生体内でグラフェンシートの結晶構造の変化を証明するものと考えられる。

起炎性については、MWCNTsのほうがH-CNFsに比較し強い傾向を示したが、このような構造の差に基づく細胞の反応が関係している可能性が示唆された。

このような長期間での埋入実験は、ナノ物質の生体に対する影響を検討する上において非常に重要であり、今後形態学的な検索のみならず、生化学的なアプローチを行う必要があるものと考えられる。

2. 多層カーボンナノチューブをコーティングしたコラーゲンスポンジのラット皮下への埋入実験について

本実験は、多層カーボンナノチューブの生体材料への応用を考えた基礎実験の一つである。コラーゲンスポンジに比較し皮下組織埋入における炎症反応はやや強い傾向を示したが、経時的に炎症反応は軽微となり、基質化が進行していることが示された。皮下に直接多層カーボンナノチューブを埋入した場

合と異なり、光学顕微鏡による観察ではあるが、ほとんどのカーボンナノチューブがマクロファージに貪食されていた。これは、コラーゲンスポンジへのコートが薄く均一になされたということを示唆している。コラーゲンスポンジが完全に吸収された後も、ナノチューブが、一定の規則性のある集塊で認められたが、このこともコーティングが均一になされていることを示唆している。スポンジをナノチューブでコーティングすることによりコラーゲンの強度の向上を図ったが十分な効果は得られなかった。今後のさらなる検討が必要と思われる。

3. カーボンナノ物質の細胞培養用スキャホールドへの応用

これまでの研究で、我々は、カーボンナノチューブ上で骨芽細胞様細胞を培養すると、細胞とカーボンナノチューブは強固に接合し、トリプシンでも剥離することが困難であることを明らかにした。本研究においては、このCNTsの生物学的特性を利用した細胞培養用スキャホールドの開発を目的とした。

細胞の形態は、コントロールであるPCと比較し、平坦で全周に伸展している形態を呈していた。SWCNTsとMWCNTsの間では、明確な形態の相違は認められなかったことから、CNTs特有の細い線維状の構造が細胞の形態に影響しているものと推察された。また、強拡大像において、細胞の仮足がCNTsと密に接しており、CNTsの骨芽細胞様細胞に対する優れた適合性が示唆された。

細胞の増殖に関しても、CNTsはPCやGPに比較し有意に優れていることが示された。細胞の増殖には、基質表面の物理的性状や化学的性状が関与することが報告されている。同じ炭素からなるGPに比較してCNTsが高い細胞増殖特性を示したことは、CNTsの持つ特有な細い線維状の構造が関与しているものと考えられた。しかし、同様の線維状構造を持つCNTsにおいてもMWCNTsとSWCNTsの間には差違が認められたことは、物理的な構造のほかにも細胞増殖に関与する因子が推察され、我々は、その一つとしてタンパクの吸着に着目した。

SWCNTsのタンパク吸着量はMWCNTsに比較し多いという結果が得られた。これは、SWCNTsとMWCNTsの化学的性質の差違を示唆している。SWCNTsは、MWCNTsに比較し、表面活性が高く、

バンドルを形成しやすいことが知られており、非特異的なタンパクの吸着が生じたと推察された。また、この結果は、SWCNTsの細胞増殖特性がMWCNTsに比較し高いことにも関係していると考えられる。

ALP活性については、総ALP活性および単位タンパクあたりのALP活性ともに、CNTsは、PC、GPに比較し高い値を示した。この結果は、CNTsの骨芽細胞の骨形成活性の促進を示唆している。

以上からCNTsは、骨芽細胞の増殖および機能を促進することが明らかとなり、骨芽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。

4. フラーレンの生体内分布の検索

本研究は、体内に摂取されたカーボンナノ物質の移行や排出を明らかにすることを目的に行われた。

ラット尾静脈から水溶性フルーレンを注入24時間後に、肝臓で明確なフルーレンのピークが検出された。検出対象とした肺、脳および脾臓の他の臓器からは検出されなかった。2年目に行った同様の実験結果では、静注1時間後に肝臓に検出され、24時間後ではいずれの臓器にも検出されなかった。これらの結果から、フルーレンが肝臓に集積することを明確に示している。排出の時間が異なった原因として、使用したフルーレンの精製方法や水溶化の方法が考えられ、わずかな化学修飾の差でも排泄に大きく影響することが示唆された。

E. 結論

カーボンナノ物質の皮下組織長期埋入時の生体反応、フルーレンの体内分布についての研究を行い、以下の結論を得た。

1. カーボンナノ物質の生体反応には、サイズや結晶構造が影響する。
2. MWCNTsおよびH-CNFsを皮下組織に長期埋入後も強い炎症反応は観察されなかった。
3. 皮下組織への長期埋入で、MWCNTsおよびH-CNFsの結晶構造も変化することが示された。
4. コラーゲンスポンジへの多層カーボンナノチューブの薄層かつ均一なコーティングが可能であり、生体材料としての可能性が示唆された。
5. CNTsの骨芽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。

6. MALDI-TOF-MS を用いることにより、フラーレンの生体内組織における検出の可能性が示唆された。

7. 水溶化フラーレンを静注すると、肝臓に検出されたが、他の臓器には検出されなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari. "Strikingly Extended Morphology of Cells Grown on Carbon Nanotubes" *Chemistry Letters*, 35, 508-9 (2006)
2. 横山敦郎 "カーボンナノチューブの細胞内挙動" *バイオマテリアル*, 24, 324 - 332, (2006)
3. N. Aoki, T. Akasaka, F. Watari, A. Yokoyama. "Carbon nanotubes as scaffolds for cell culture and effect on cellular functions" *Dental Materials Journal*. 26;178-185,2007.
4. Aoki,N., Yokoyama,A., Nodasaka,Y., Akasaka,T., Uo,M., Sato,Y., Tohji,K., Watari,F. "Carbon Nanotubes Deposited on Titanium Implant for Osteoblast Attachment" *Journal of Bionanoscience*.1:14-16,2007.
5. . Wang, F. Watari, M. Omori, S. Liao, Y. Zhu, A. Yokoyama, M. Uo, H. Kimura, A. Ohkubo. "Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials" *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*. 82B:223-230,2007.
6. Wang, W., Yokoyama, Liao, S., A.Omori, M., Zhu, Y., Uo, M., Akasaka, T., Watari, F., "Preparation and Characteristics of a binderless carbon nanotube monolith and its biocompatibility" *Materials Science & Engineering C*. 28;1082-1086.2007.
7. Sakaguchi N, Watari F, Yokoyama A, Nodasaka Y "High-resolution Electron Microscopy of Multiwalled Carbon Nanotubes in the Subcutaneous Tissue of Rats". *Journal of Electron Microscopy (Tokyo)*.57;159-164,2008.
8. Sato Y, Yokoyama A, Kasai T et al. In vivo Rat Subcutaneous Tissue Response of Binder-Free Multi-Wall Carbon Nanotube Blocks Cross-Linked by De-Fluorination. *Carbon* 46;1927-1934,2008.
9. 平田 恵理:カーボンナノチューブコートしたコラーゲンスポンジの3次元培養担体への応用: DE No.168.32-33
10. Eri Hirata, Motohiro Uo, Hiroko Takita, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Atsuro Yokoyama: Development of a 3D collagen

scaffold coated with multiwalled carbon nanotubes. *J Biomed Mater Res B; in press*

5. 学会発表

1. 青木尚史, 山本悟, 大堀ことは, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘, 巨理文夫, 佐藤義倫, 田路和幸, 菫澤崇. "カーボンナノ物質に対する生体反応—生体材料への応用と生体内分布—" ナノ微粒子体内動態可視法の開発第1回研究成果発表会. 千歳, 2006
2. 青木尚史, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘, 佐藤義倫, 田路和幸, 巨理文夫. "単層カーボンナノチューブを用いた細胞培養用スキヤホールドと細胞反応" 第2回ナノトキシコロジーと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会. 要旨集 15, 札幌, 2006.
3. N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, F. Watari. "Biomedical applications of single-walled carbon nanotubes for a scaffold." 84th General Session of International Association for Dental Research Brisbane, Australia, 2006.
4. N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, "Response of osteoblastic cells grown on carbon nanotubes scaffold" 31st Fullerene-Nanotubes General Symposium, Tsu, 107, 2006.
5. N. Aoki, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, A. Yokoyama. "Applications of carbon nanotubes as implant surface modification." 2nd Annual Meetings for Asia Academy of Osseointegration. Osaka, 2006.
6. 横山敦郎 "カーボンナノチューブの細胞内挙動" 第28回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 69, 東京, 2006
7. 青木尚史, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘, 佐藤義倫, 田路和幸, 巨理文夫. "カーボンナノチューブの細胞培養用担体への応用" 第3回ナノトキシコロジーと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会. 仙台, 2006
8. 横山敦郎, 青木尚史, 山本悟, 大堀ことは, 野田坂佳伸, 赤坂司, 宇尾基弘, 巨理文夫, 佐藤義倫, 田路和幸, 菫澤崇. "カーボンナノ物質に対する生体反応—生体材料への応用と生体内分布—" ナノ微粒子体内動態可視法の開発第2回研究成果発表会. 鳴門, 2007.
9. Hirata,E., Yokoyama,A., Sato,Y., Nodasaka,Y., Uo,M., Akasaka,T., Tohji, K. Watari,F. Biocompatibility of Carbon Nanosubstances in the Subcutaneous Tissue. The 33rd Fullerene-Nanotubes General Symposium. July 11-13, 2007. Fukuoka.
10. 平田恵理, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 宇尾基弘, 赤坂司, 田路

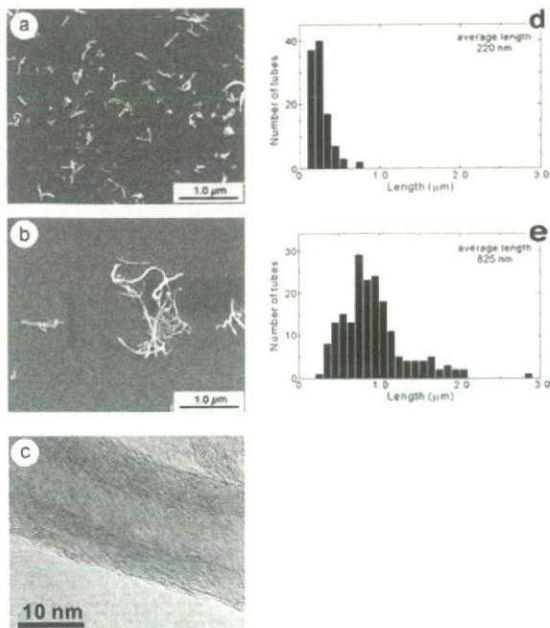
- 和幸, 亘理文夫 カーボンナノ物質の構造が生体反応に与える影響について, 第4回ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会, 平成19年8月1日, 東京
11. 平田恵理, 野田坂佳伸, 佐藤義倫, 葦澤崇, 赤坂司, 宇尾基弘, 大堀ことは, 亘理文夫, 田路和幸, 横山敦郎. ナノ物質の生体内挙動について—皮下および骨膜下での反応とフラージェンの体内移行—厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業 ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発第3回研究成果発表会, 平成19年11月12-13日, 登別
12. 平田恵理, 野田坂佳伸, 佐藤義倫, 葦澤崇, 赤坂司, 宇尾基弘, 大堀ことは, 亘理文夫, 田路和幸, 横山敦郎. ナノ物質の生体内挙動について—カーボンナノ物質の構造が生体反応に与える影響—について, 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, 平成19年12月18日, 名古屋
13. 横山敦郎, 佐藤義倫, 葦澤崇, 赤坂司, 高橋ともみ, 笠井孝夫, 田路和幸, 亘理文夫. カーボンナノ物質の生体内での動態—ラット尾静脈より注入した水溶性フラージェンの生体内分布— 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業 ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発第3回研究成果発表会, 平成20年2月25-26日, 苫小牧
14. 平田 恵理 宇尾 基弘 横山 敦郎 亘理 文夫 :カーボンナノチューブコートしたコラーゲンスポンジの3次元培養担体への応用. : 第 51 回日本歯科理工学会 (抄) 歯科材料・器械 27:138 (2008.4)
15. Eri Hirata, Motohiro Uo, Hiroko Takita, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Atsuro Yokoyama : Multiwalled carbon nanotube coating of 3D cell culture scaffold. International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (2008.6)
16. Eri Hirata, Motohiro Uo, Hiroko Takita, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Atsuro Yokoyama : 3Dscaffold with carbon nanotube coated collagen sponge. 86th General Session & Exhibition of the IADR. Tronto, Canada (2008.7)
17. 平田 恵理 宇尾 基弘 横山 敦郎 亘理 文夫 :カーボンナノチューブコートした3次元培養担体の作製と評価: ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発 平成20年度冬期第5回研究成果発表会 (2009.2)

G. 知的所有権の取得状況

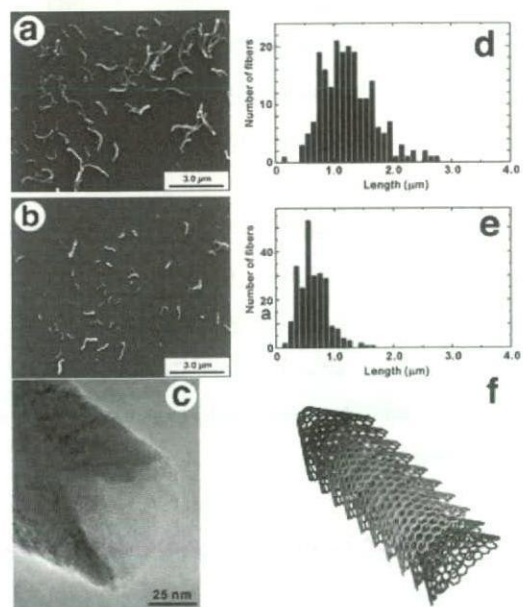
1. 特許取得

無し

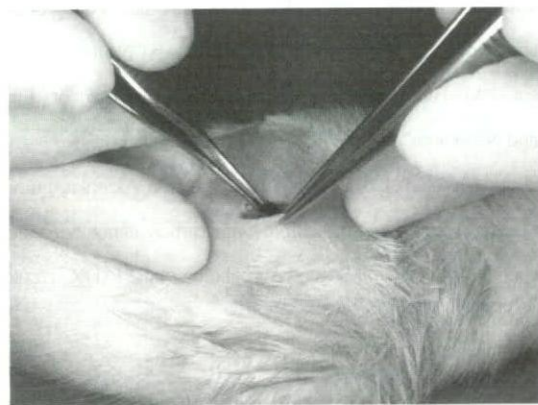
2. 実用新案取得



☒ 1



☒ 2



☒ 3

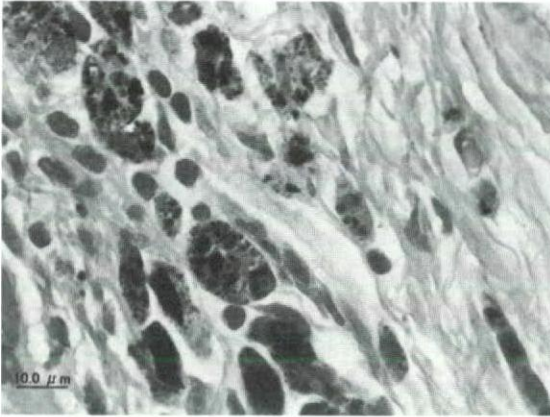


图 4-1

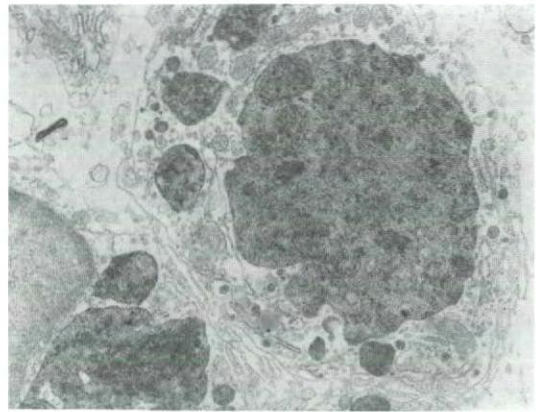


图 4-2

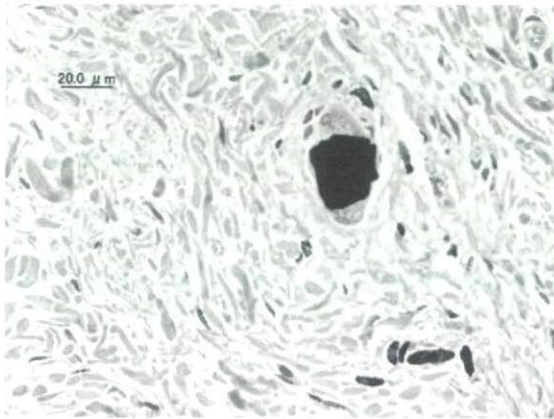


图 4-3

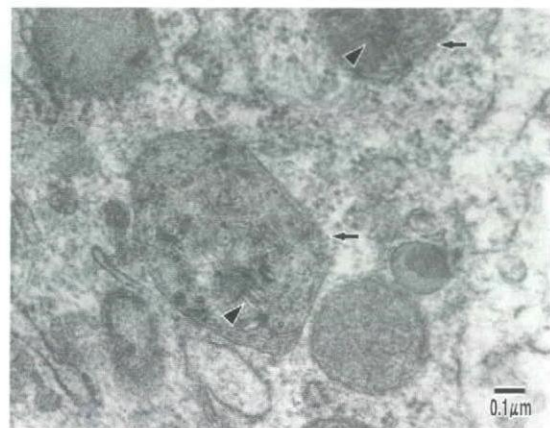


图 4-4

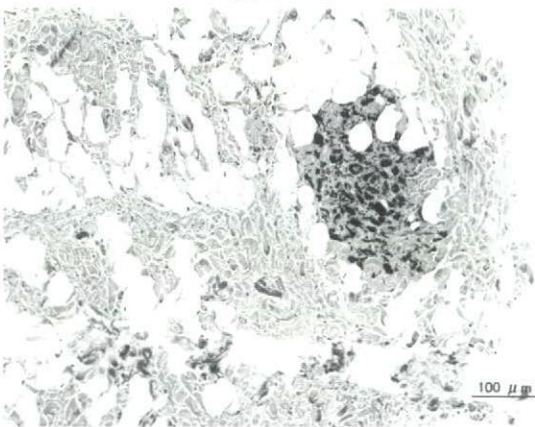


图 4-5

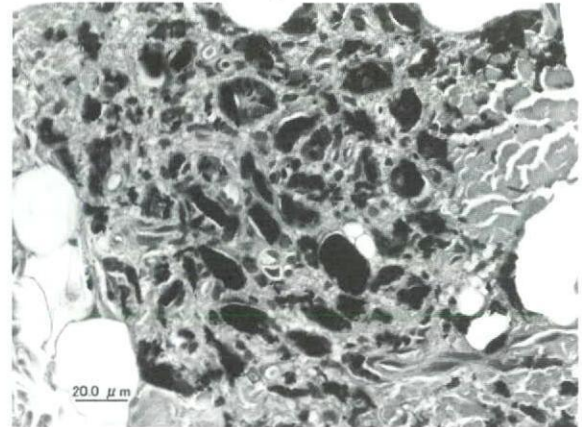


图 4-6

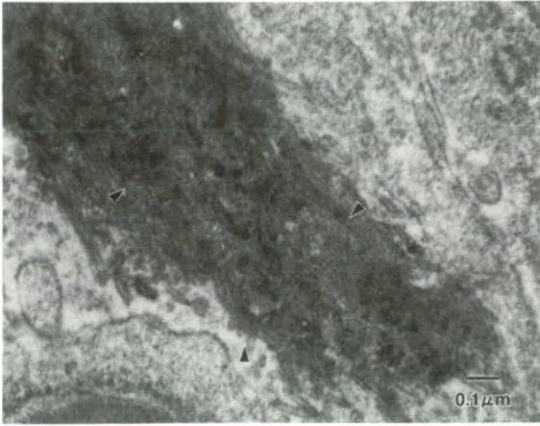


图 4-7

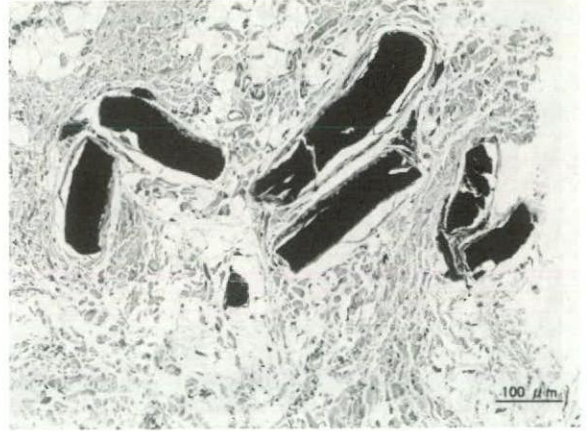


图 4-8



图 4-9

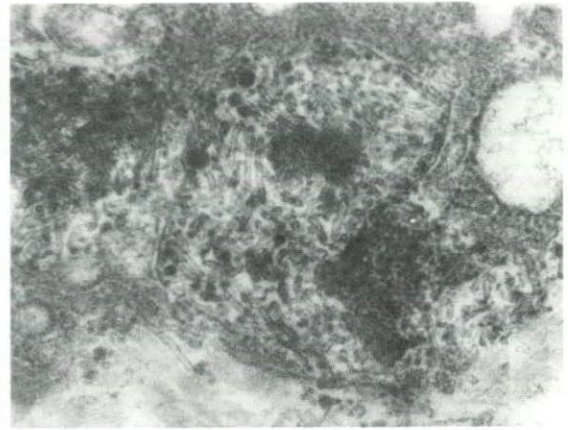


图 4-10

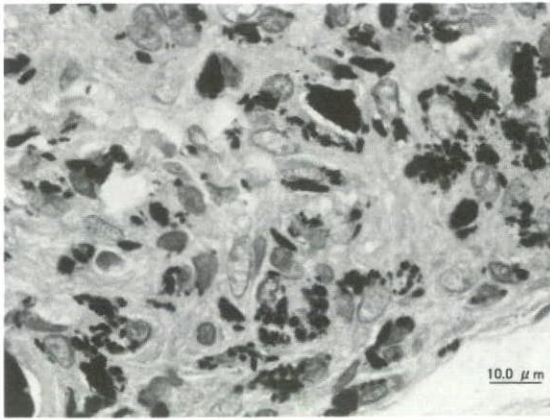


图 4-11



图 4-12

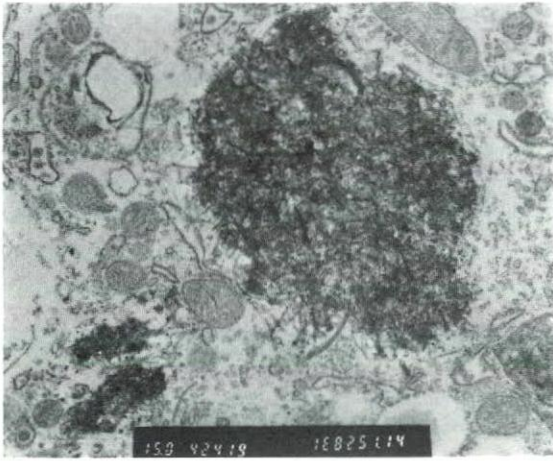


图 4-13

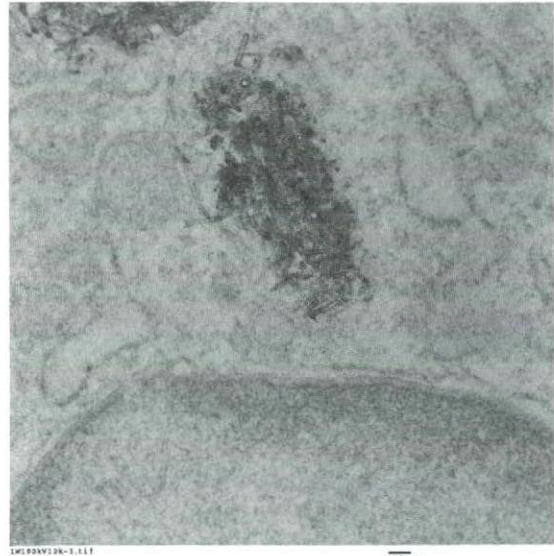


图 4-14

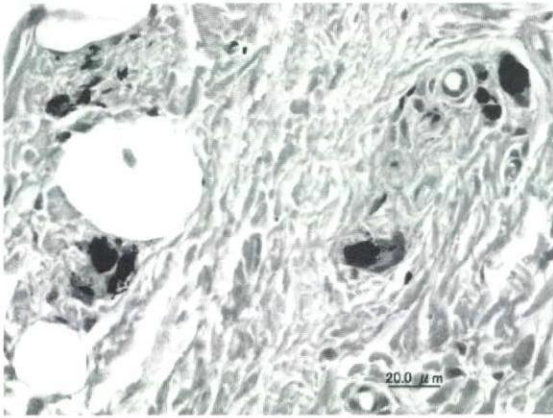


图 4-15

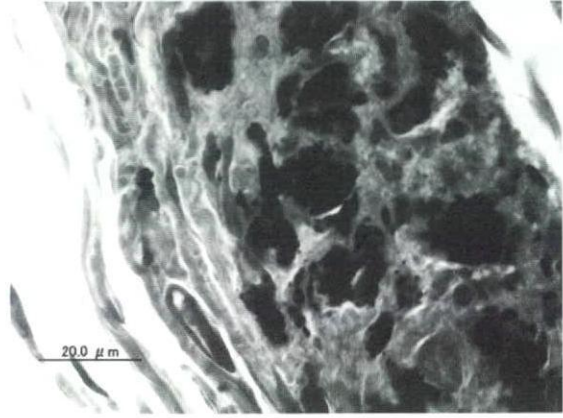


图 4-16



图 4-17

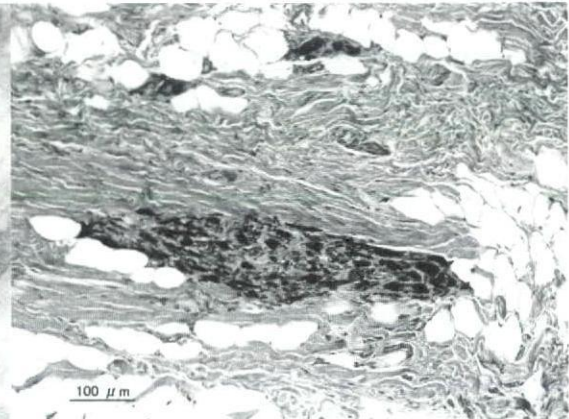


图 4-18

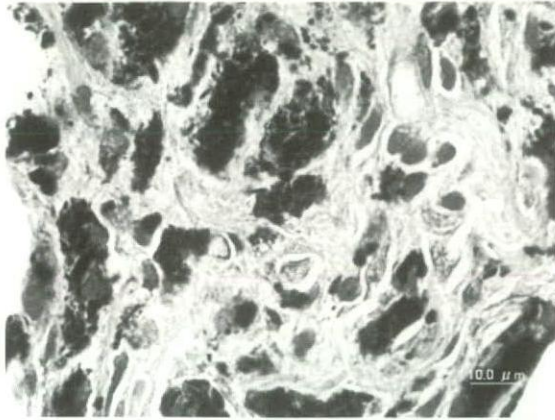


图 4-19

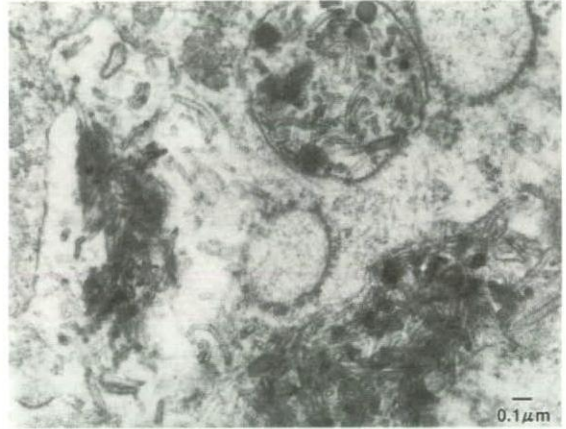


图 4-20

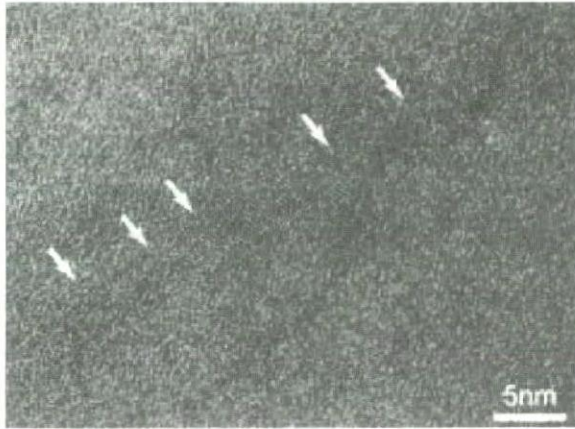


图 4-21

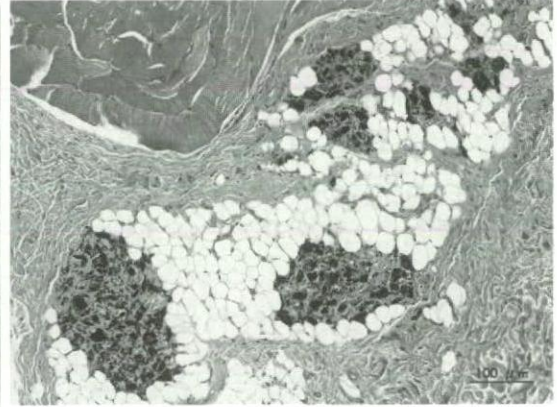


图 4-22

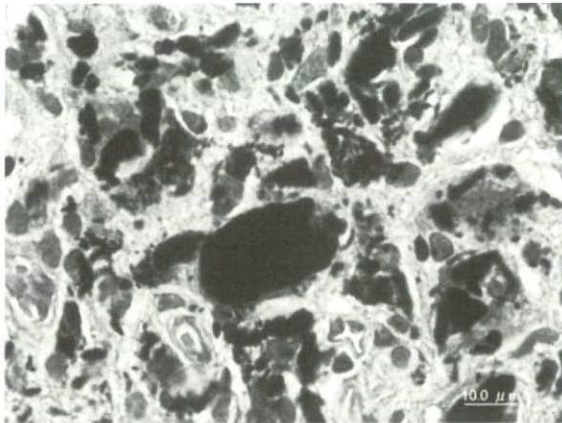


图 4-23

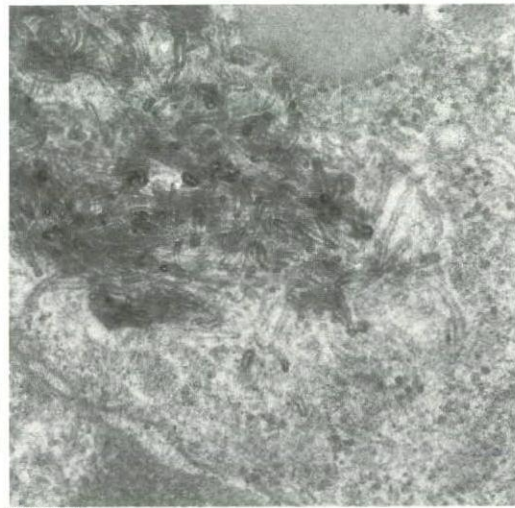
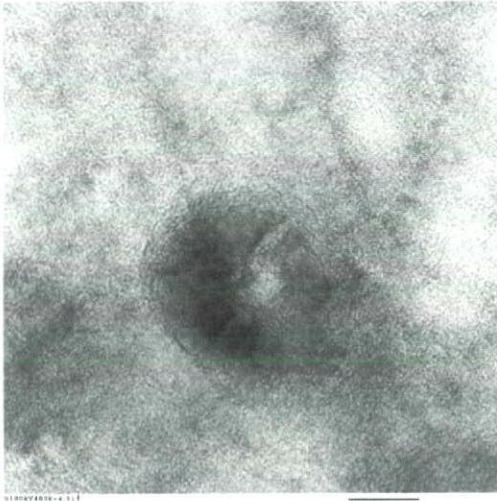


图 4-24



25 um
MFC-100LV
Olivetti Mag. 10000x
AMT Camera System

☒ 4-25

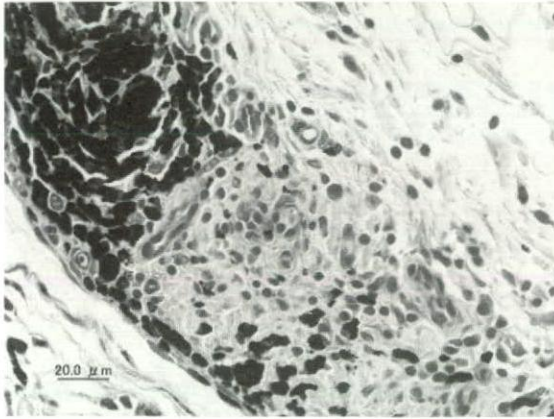


图 5-1

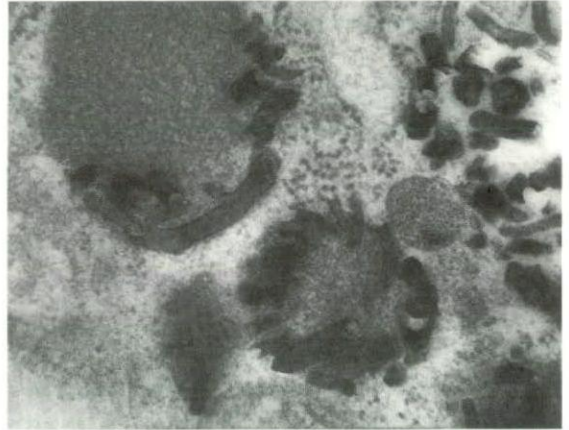


图 5-2

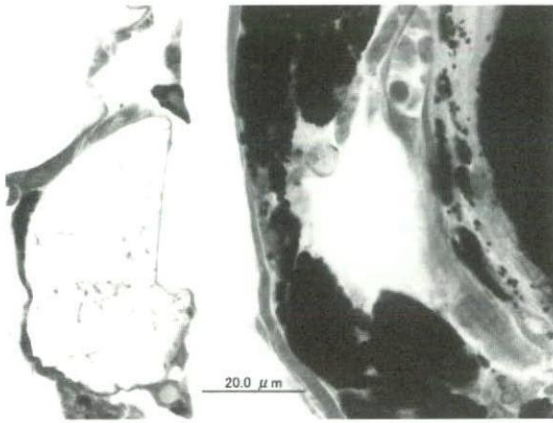


图 5-3

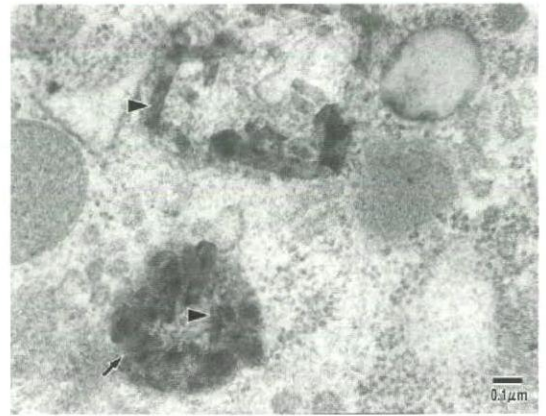


图 5-4



图 5-5



图 5-6

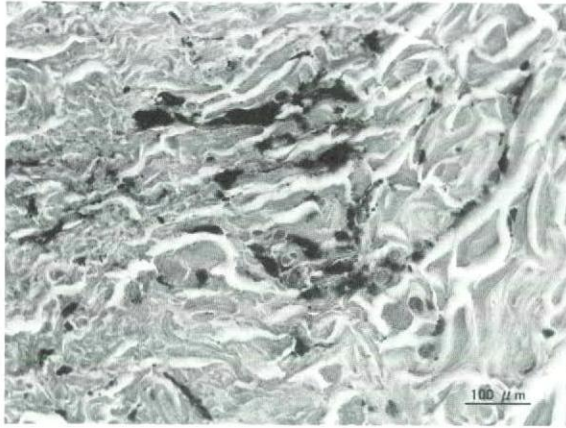


图 5-7

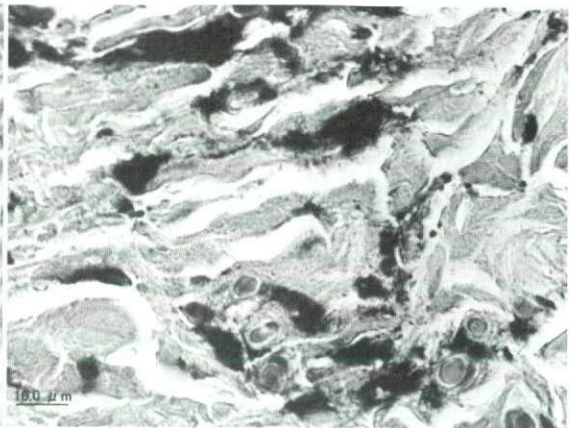


图 5-8

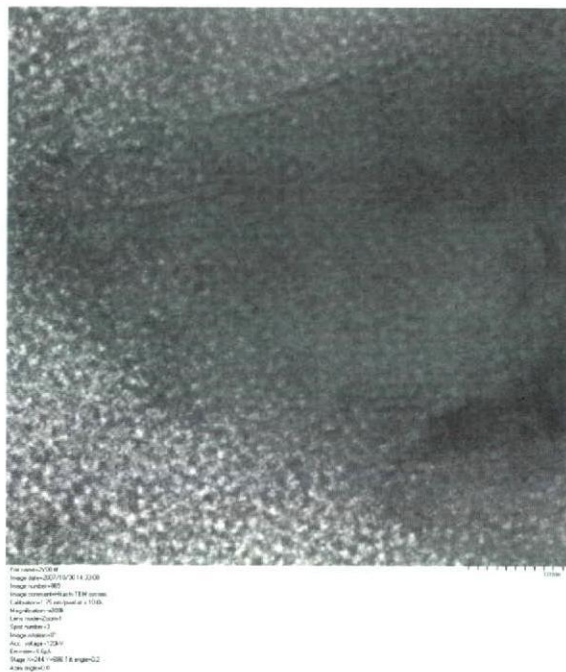


图 5-9



图 5-10

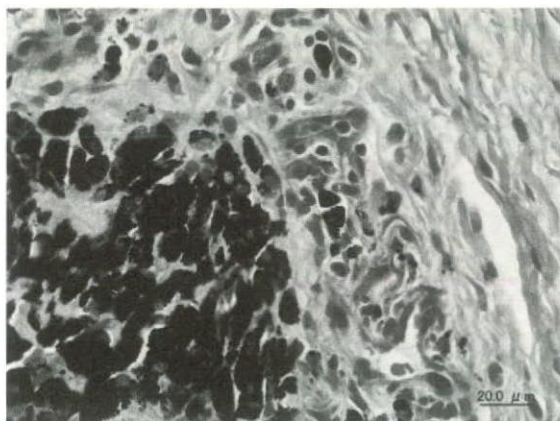


图 5-11

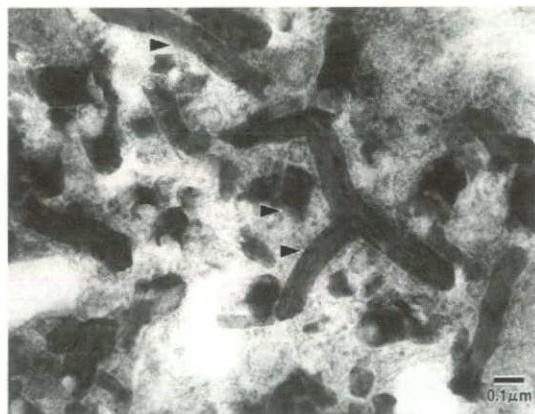


图 5-12

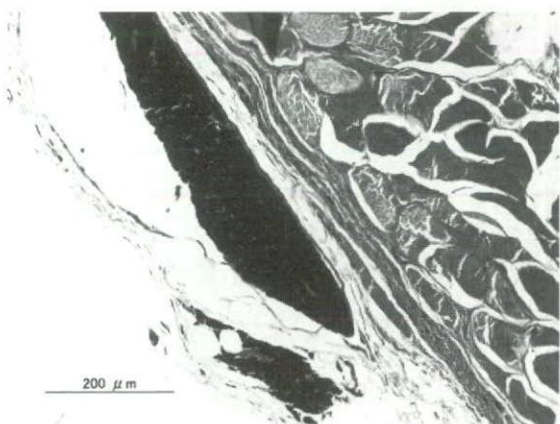


图 5-13



图 5-14

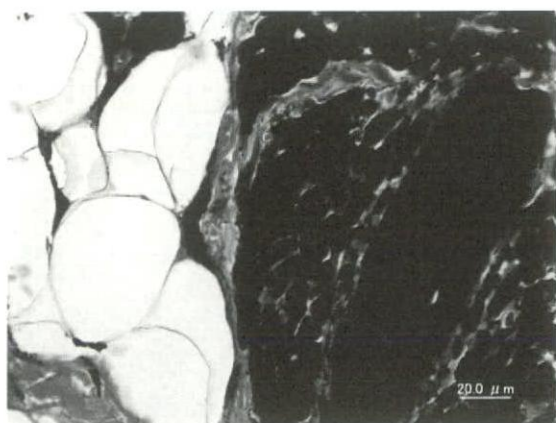


图 5-15



图 5-16

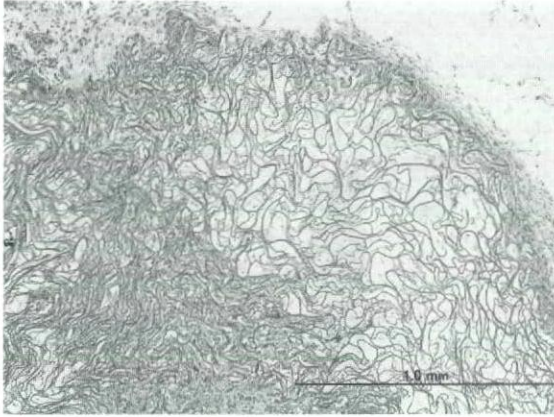


图 6-1

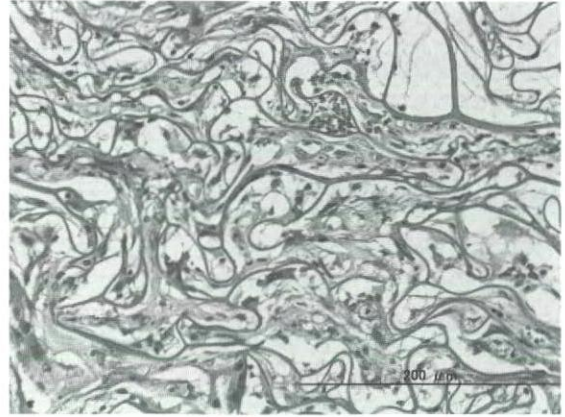


图 6-2

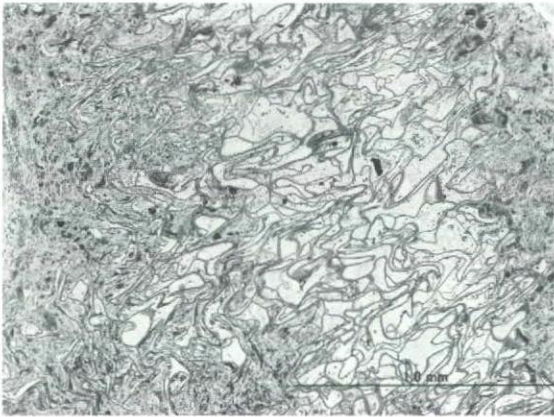


图 6-3

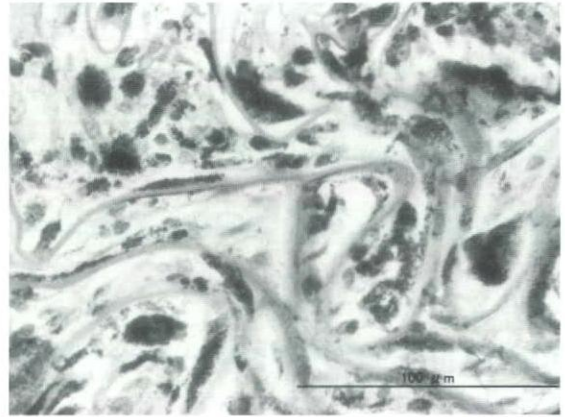


图 6-4



图 6-5

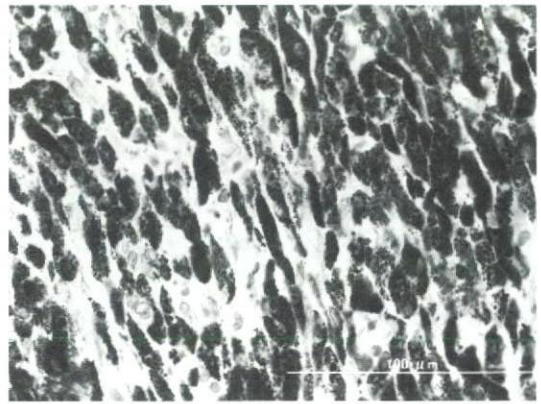


图 6-6