

図1 図中の電流を24時間流して水素をチャージしたNi-Ti合金の応力-ひずみ曲線

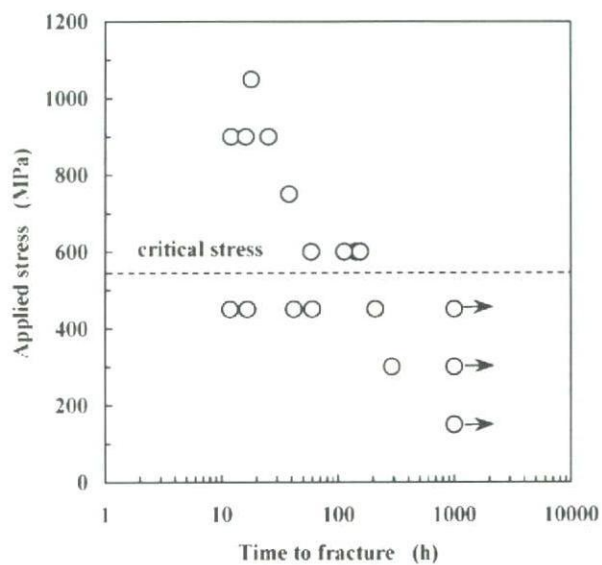


図3 Ni-Ti 超弾性合金に一定応力を加えながら0.9% NaCl+1% H₂O₂ 溶液に浸漬したときに腐食破断するまでの時間

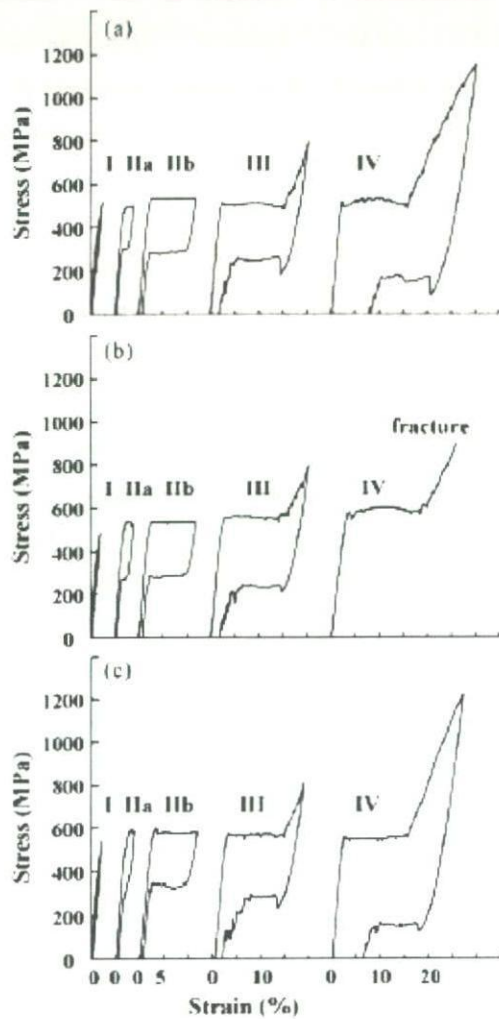


図2 Ni-Ti 超弾性合金線の応力-ひずみ曲線 (a)は未処理の合金 (b)は10A/m²で2時間水素をチャージした合金 (c)は(b)を24時間室温中に放置してから測定した応力-ひずみ曲線

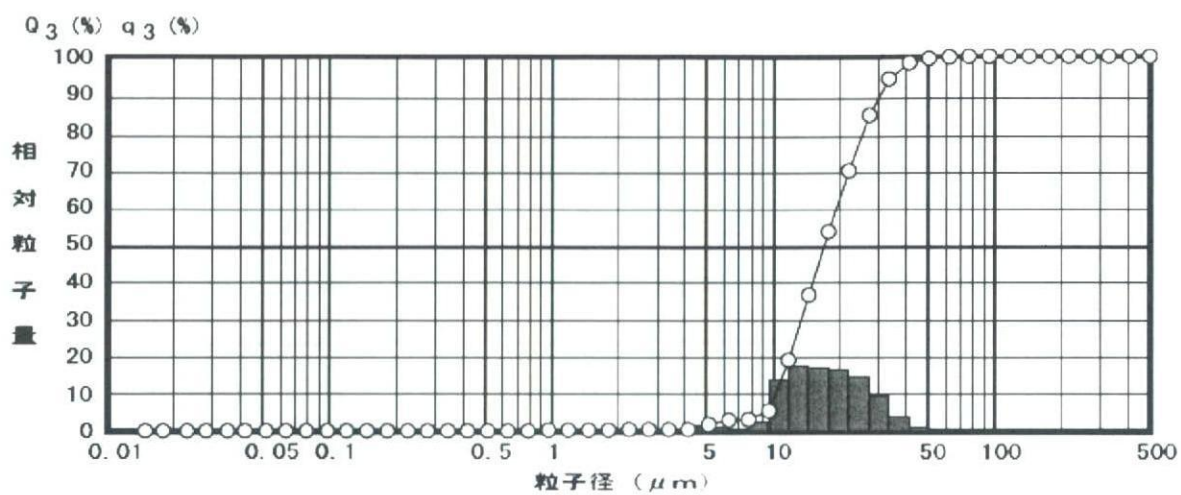
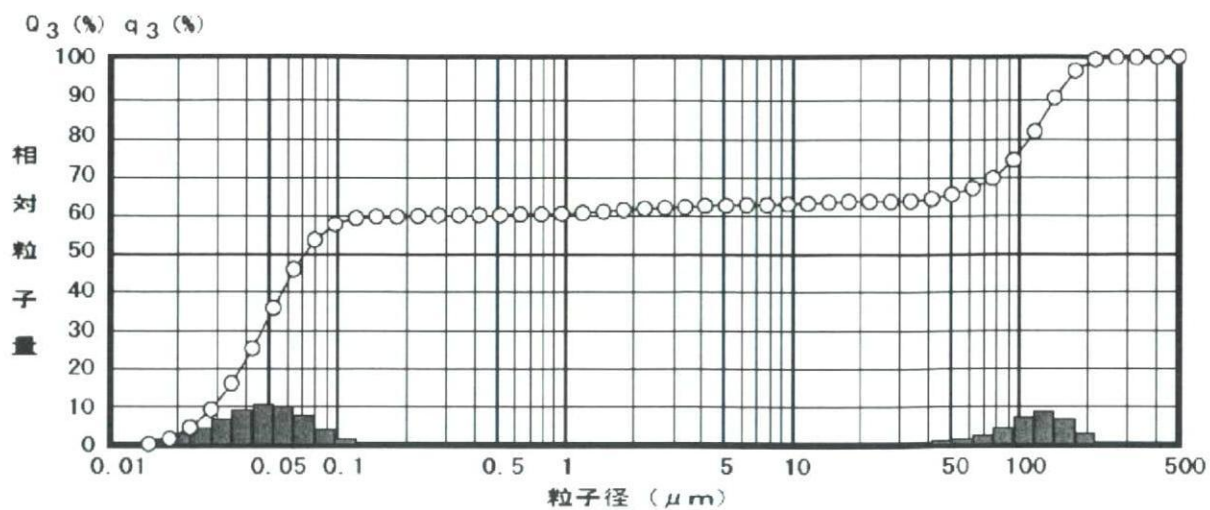


図4 Ni-Ti 超弾性合金を0.9% NaCl 溶液中で24時間10Vの電圧で電流を流したときに発生した腐食生成物の粒度分布

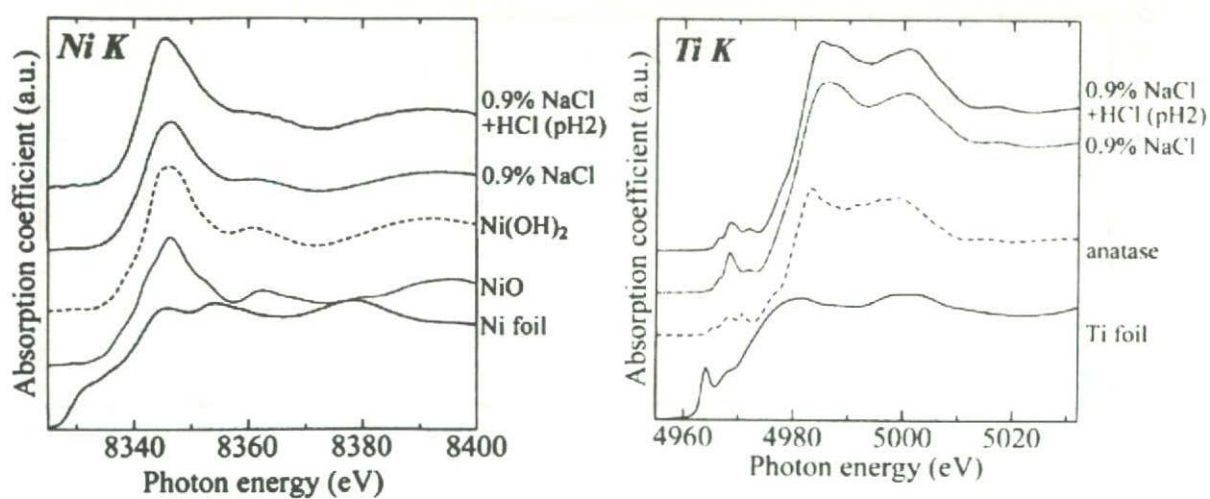


図5 Ni-Ti合金腐食生成物のXANESスペクトル

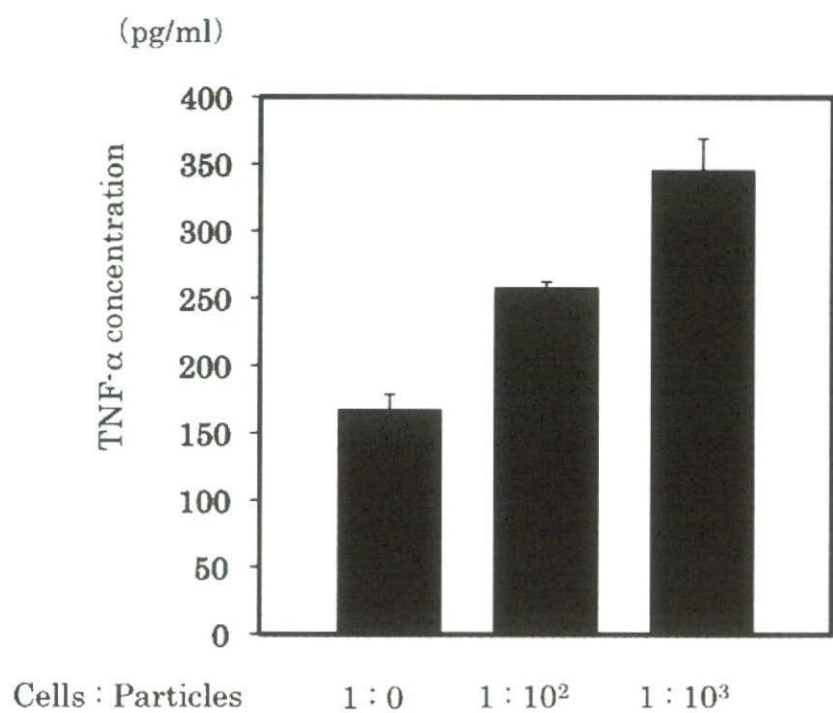


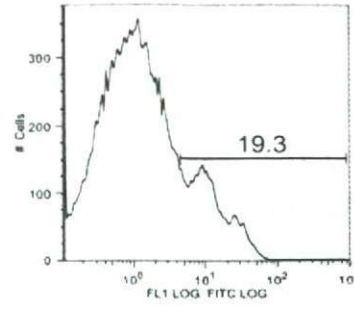
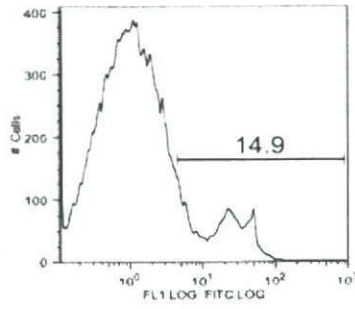
図6 Ni-Ti合金腐食粉末により誘導されるTNF- α の産生

Cells : Particles

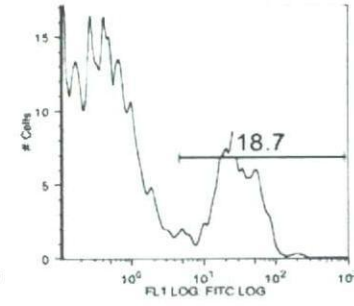
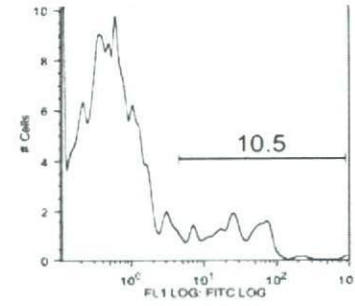
1 : 0

1 : 10²

RAW264.7



MC3T3E-1



Annexin V

図7 Ni-Ti合金腐食粉末によるアネキシンV陽性細胞の増加

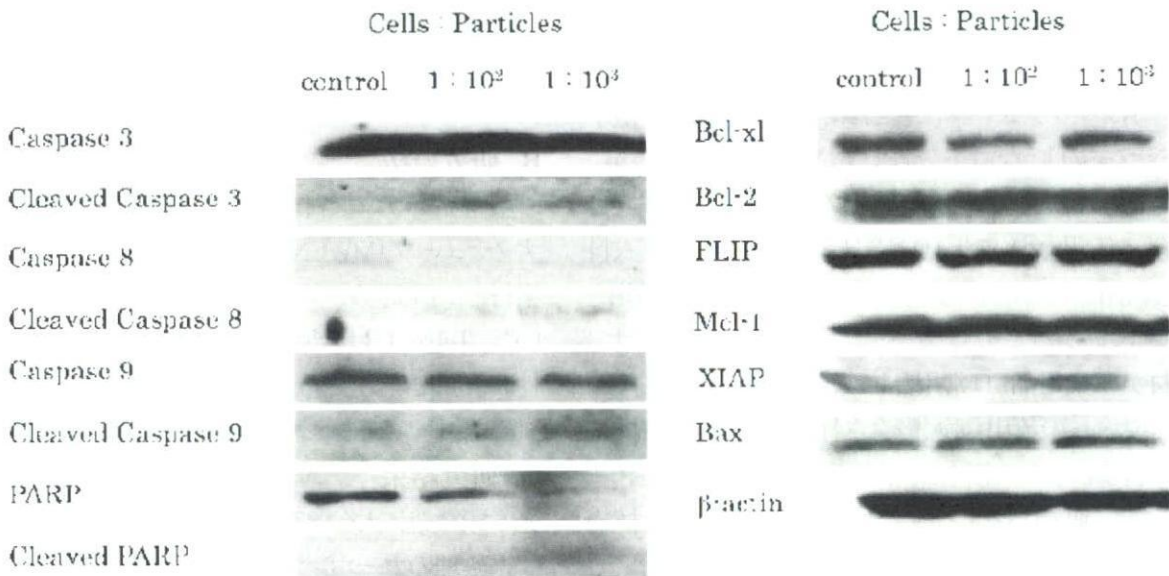


図8 Ni-Ti合金腐食粉末のアポトーシス関連蛋白の発現への影響

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の植物に対する反応性の評価に関する研究

分担研究者	古月文志	北海道大学大学院地球環境科学研究院教授
研究協力者	藤井明洋	北海道大学大学院地球環境科学研究院院生
研究協力者	林 春	北海道大学大学院地球環境科学研究院院生
研究協力者	譚 晓明	北海道大学大学院地球環境科学研究院院生

研究要旨

本研究は、ナノ材料の植物培養細胞に対する毒性の評価、すなわち、ナノ材料の「ファイト・トキシコロジー」に関するものである。イネ培養細胞である OS-1 細胞 (*Oryza sativa* L.)、タバコ培養細胞である BY-2 (*Nicotina tabacum* L. cv. *Bright Yellow* 2) およびシロイヌナズナ培養細胞である T8 細胞を対象細胞として用い、カーボンナノチューブを含めた数種類のナノ素材のファイト・トキシコロジーについて検討した。ナノ素材を培地又は培養液に添加した後、細胞の培養実験を行なった。その結果、所謂「ナノ材料の毒性」は、ナノ材料の化学成分、物理状態および「有効添加量」等のパラメーターと深く関連することが判った。

A. 研究目的

ナノ素材、とりわけ日本発のナノ素材であるカーボンナノチューブの産業応用開発が進められている。カーボンナノチューブは、これまで、燃料電池や電子エミッターのような電子分野で主に使用されていたが、最近、「カーボンナノチューブ加工衣料用繊維(日本経済新聞、2007年10月7日第1面)」といった衣料にも利用されるようになり、ナノ素材が身近な消費財として広く広がってきた。カーボンナノチューブ等のナノ素材が工業用品・日常用品に広く使われることに伴い、その環境への流出も強く懸念されている。排水や排気中に含まれるナノ素材は、植物と接する機会は、言うまでもなく、動物と接する機会よりも多い。しかし、「植物が介入したナノ素材の生態系への拡散・侵入」といったルートに関する研究は殆ど行なわれていない。そこで、今回は植物培養細胞を用い、ナノ素材の安全性について評価実験を行った。植物培養細胞としては、理研バイオリソースセンターが保存提供を続けているシロイヌナズナ(T87、2000年に植物として始めて全ゲノム塩基配列が解読され、モデル植物として広く使われている)を用いた。また、対照実験としては、イネ培養

細胞である OS-1 細胞 (*Oryza sativa* L.) およびタバコ培養細胞である BY-2 (*Nicotina tabacum* L. cv. *Bright Yellow* 2)も用いた。

B. 研究方法

炭素系のナノ素材としては、多層タイプのカーボンナノチューブ(MWCNTs)を選んだ。また、対照のナノ素材としては、カーボンブラックおよびアスベストを用いた。Table 1 は今回の実験に用いたMWCNTsの物性および処理方法を示す。

C. 研究結果

光学顕微鏡によるT87/CNTs相互作用に関する検討

未処理のカーボンナノチューブ(P-MWCNTs)、超音波処理したカーボンナノチューブ(U-MWCNTs)および界面活性剤を用いた分散処理したカーボンナノチューブ(D-MWCNTs)をそれぞれ培養液に添加し、シロイヌナズナ細胞T87に対する暴露実験(懸濁培養)を行った。カーボンナノチューブの細胞表面への付着に起因すると思われる暗所が数多く観察された(右の図1)。しかし、アスベスト(ASB)暴露実験(図1、右図)で観察された細

胞壁の破損に伴うミトコンドリアや葉緑体の流出、いわゆる、細胞壁/膜の損傷に起因する典型的細胞死のような状況には至らなかった。

重量測定法による細胞増殖に対するCNT影響の評価

シロイヌナズナ細胞T87の増殖量(ドライウエイト)を測定した。その結果、カーボンナノチューブの培養液への添加(添加量、10 mg/L)に起因すると思われる増殖量の減少が見られた。図2は、移植後7日目の細胞増殖量を示す。コントロールサンプル(通常の条件下での培養、Ctrl)の増殖率を100%とすると、P-MWCNTs、U-MWCNTs およびD-MWCNTsを添加した場合、その増殖率は、それぞれ、80.3%、74.2%、83.3%であった。T87増殖率の減少は、カーボンブラックを添加した場合(増殖率、66.7%)と比べ顕著な差が見られなかった。ここで、特筆すべきことは、カーボンナノチューブはアスベスト(増殖率、50%)と比べ、そのT87細胞の増殖に対する抑制力が遥かに弱いものであった。

TTC法による細胞生存率の測定 TTC法を用い、シロイヌナズナ細胞T87の生存率を測定した。その結果は図3に示す。カーボンナノチューブの添加によるT87の生存率の減少が見られた。しかし、その減少量は、アスベストと比べ遥かに少ない(カーボンブラックよりも少ない)。また、分散剤として用いた両性イオン界面活性剤はシロイヌナズナ細胞T87の成長周期に対して影響するものの、その生存率に対する影響が見られなかった。

濃度依存性に関する評価 カーボンナノチューブおよび対照ナノ素材(カーボンブラックおよびアスベスト)の添加量を変化させ(添加量、5 mg/L; 10 mg/L; 50 mg/L)、ナノ素材の添加量の影響について調べた。シロイヌナズナ細胞T87の生存率はナノ素材の添加量の増加と共に、ほぼ直線的に減少することがわかった。

D. 考察および結論

カーボンナノチューブはシロイヌナズナ細胞T87に対して、いわゆる「ネガティブ的な効果」があったことは、形態観察、重量測定および生存率測定の実験結果から結論することができる。しかし、いわゆる「カーボンナノチューブ毒性」は、その程度はアスベストと比べ極めて低いこと、ある意味ではカーボンブラックよりも低いことを言える実験データが得られた。また、カーボンナノチューブのような炭素ナノ素材がその製造技術の進化により、これまでに知られていた生体反応で支配的な触媒効果又はイオン溶出に基づく化学的效果とは異なり、サイズ・形状に依存した物理的な効果に基づく生体効果が発現することになるであろう。カーボンナノチューブのサイズ・形状効果を生かした植物分野におけるCNT応用に関する研究は本研究室で行なわれている。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Xiao-Ming Tan, Bunshi Fugetsu, Multi-walled carbon nanotubes interact with cultured rice cell: evidence of a self-defense response, *Journal of Biomedical nanotechnology*; 3, 285 (2007).

2. 学会発表

1. Akihiro Fujii, Bunshi Fugetsu, International Symposium on Metallomics 2007, Nagoya, November 28-December 1, 2007

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

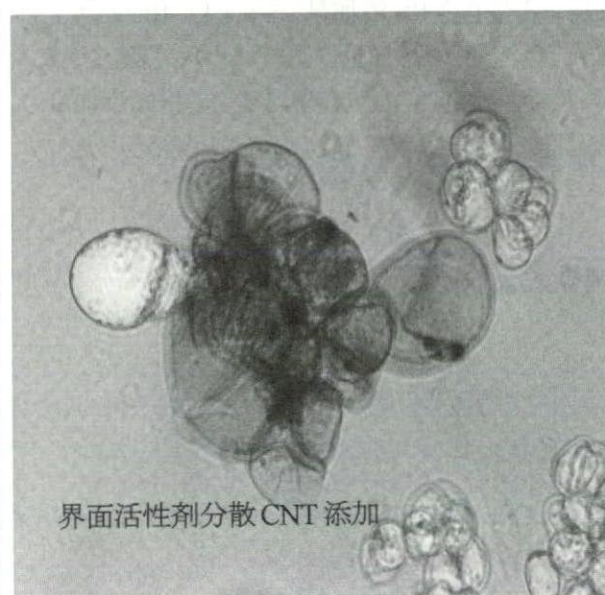
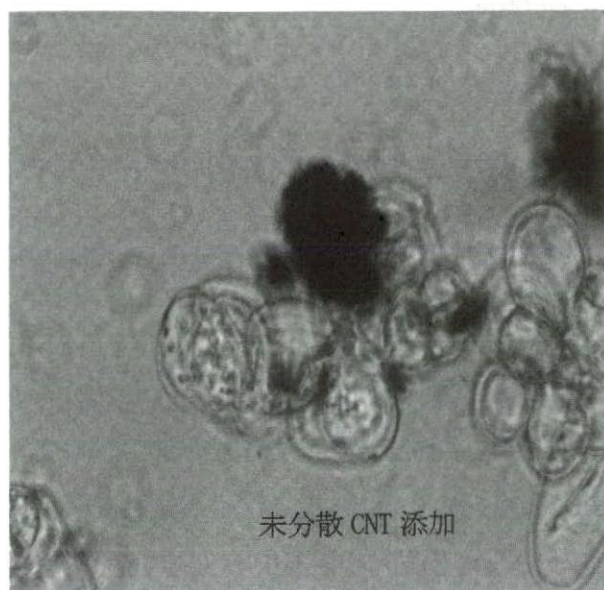
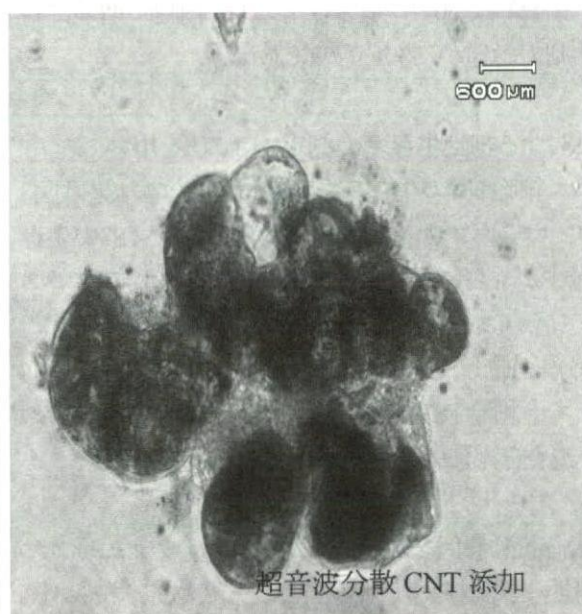
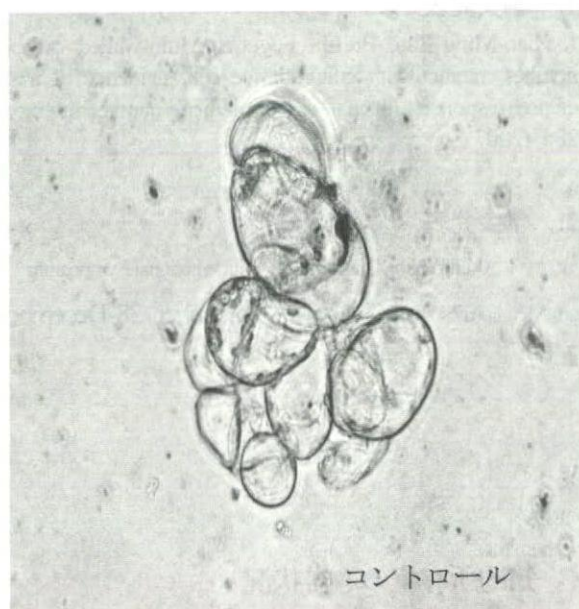
2. 実用新案取得

なし

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.



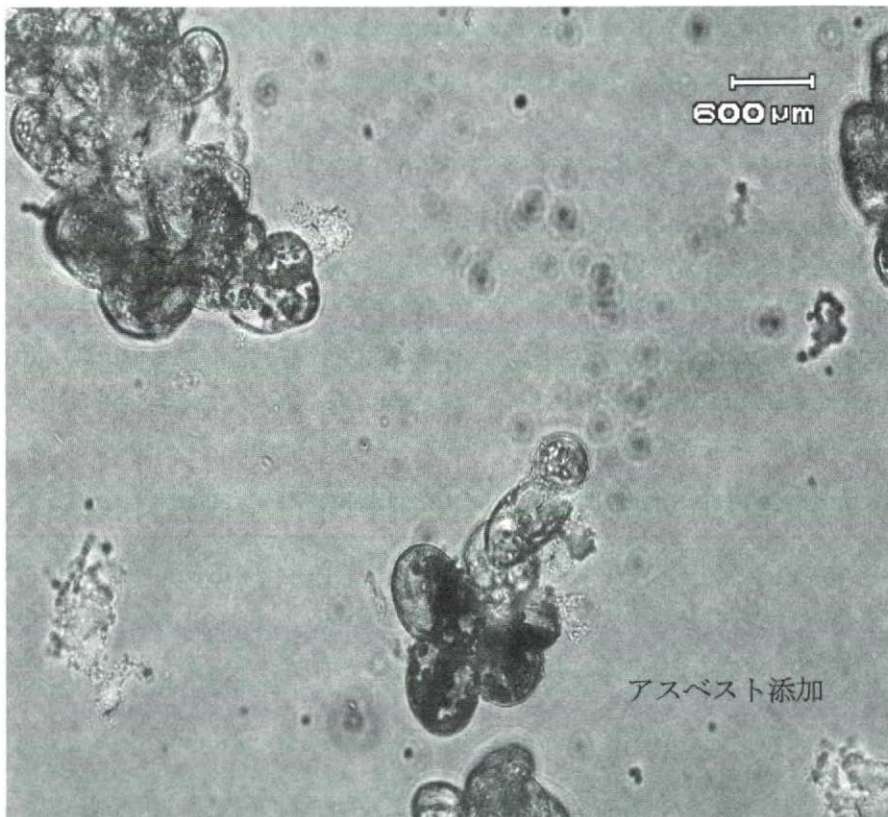


Figure 1 Observation of the suspension cultured T87 cells using light microscopy.

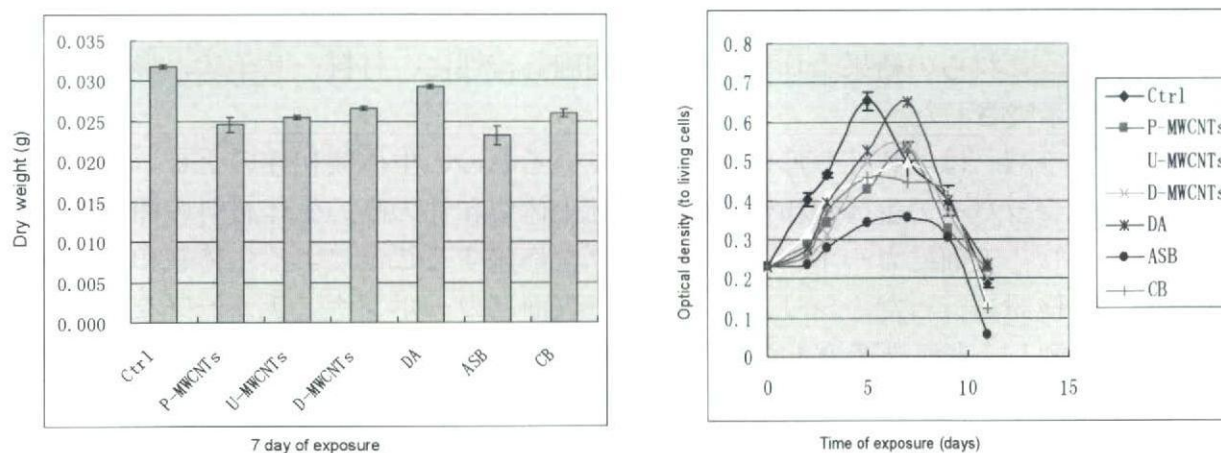


Figure 2 Dried weights (average values of three measurements) of the suspension cultured T87 for the control samples (Ctrl) and those with addition of P-MWCNTs, U-MWCNTs, D-MWCNTs, carbon blacks (CB), the zwitterionic dispersant (DA), and asbestos(ASB), respectively (left-figure).

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

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 一般に生体親和性が優れているといわれる生体材料も微粒子の場合には生体親和性が異なることが臨床では認められている。しかし、これまでどのような微粒子が生体に影響を及ぼすかについては、十分検討されていない。今回、顎口腔領域で使用されることの多いチタン微粒子とバイオ応用を目標としているカーボンナノチューブなどの金属の生体親和性について、好中球を用いて検討を行った。金属微粒子を採血したヒト末梢血から分離した好中球と混和して、好中球の細胞生存率、乳酸脱水素酵素活性値、活性酸素生産量、サイトカイン生産量を測定した。その結果、すべてのサイズのニッケルと 10 μm 未満の金属粒子は細胞為害性が高く、好中球は炎症反応を起こしていることが示唆された。また、チタンの針状と球状では針状の方が、細胞為害性が高く、これらの結果より、微粒子の細胞為害性に、材料、サイズ、形状が影響することが示唆された。

シリコンラバー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。そこで、シリコンラバーの生体親和性を向上させ生体親和性の高い生体材料の開発することを目的とし、表面にカーボンナノチューブを修飾することによる生体親和性の向上を目的とし検討を行った。シリコンラバー表面にカーボンナノチューブをコートした材料を作製し、表面構造の走査型顕微鏡(SEM)による観察、表面粗さの測定、アルブミン吸着の測定、接触角の測定を行った。さらに、このシート上で細胞培養を行い、増殖細胞数の計測、細胞の形態観察を行った。その結果、カーボンナノチューブ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10倍の接着細胞数の増加が認められた。これは、カーボンナノチューブ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、カーボンナノチューブで表面修飾を行うことで、材料表面の生体親和性を向上することが示され、カーボンナノチューブ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

今日の臨床において生体材料が治療に使用されているが、その際に化学的安定性や生体親和性が問題となる。チタンは顎口腔領域で使用される金属の中でもその表面に安定した不動態酸化被膜を作ること

から、耐食性に優れた生体親和性の良い材料とされており、おもにデンタルインプラントや骨接合用のミニプレートとして用いられる。しかし、チタンインプラント周囲の軟組織中にチタン微粒子の存在を報告した論文が多数あり、またチタンイオンが細胞

機能を阻害するとの報告がある。したがって一般に生体親和性が優れているとされている生体材料も微粒子の場合には生体親和性が異なることが予想される。しかし、これまでどのような微粒子が生体に影響を及ぼすか、あるいは影響を及ぼす場合どのような因子が関連するかについては、まだ十分に検討されていない。今回われわれは顎口腔領域で使用されることの多いチタン微粒子やほかの金属微粒子の生体親和性、および生体親和性に影響する因子について、好中球を用いて検討を行った。

また、われわれはナノ材料として特にカーボンナノチューブ (CNT) に着目し、これを応用することで生体親和性に優れた生体材料の開発が可能ではないかと考えた。CNT は、その機械的・電気的特性からナノテクノロジーの様々な分野での応用が期待されている素材であり、われわれの研究グループでも既に CNT シート上での細胞培養を行い良好な増殖を認めている。シリコンラバーは柔軟性や形成性に優れているが、生体親和性に乏しく生体を使用した場合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。そこで、柔軟で生体親和性の高い生体材料の開発することを目的とし、まず CNT それ自体が細胞へ及ぼす影響を評価するため CNT 上での細胞接着性・増殖性および CNT 上で長期的に継代・培養を行うことによる影響などについて検討し、さらにシリコン表面に CNT を応用することが細胞親和性に与える影響に関して検討を行った。

B. 研究方法

チタン、鉄、ニッケル、二酸化チタン、アルミナ、シリカ酸化鉄の粒子のナノからマイクロサイズのもの、および CNT を使用した。チタンについては針状および球状の形態のものを使用した。健常人から採血した後、通法に従い分離した好中球に、各微粒子の試料を混和し 37°C で 30 分間インキュベートしたものを検体とし、細胞生存率、活性酸素産生量、サイトカインを測定した。細胞生存率は各検体をトリパンブルーで染色し色素排除法にて光学顕微鏡下で生細胞をカウントし算定した。活性酸素産生量はチトクローム C 還元法で各検体を PMA で刺激して好中球から産生された活性酸素産生量を測定した。サイトカインは ELISA 法により好中球から放出された TNF- α の産生量を測定した。

次に、CNT の細胞に及ぼす影響を評価するため、単層カーボンナノチューブ：SWCNT (名城ナノカーボン社製、純 95%以上) および、多層カーボンナノチューブ：MWCNT (NanoLab 社製、純度 99%以上) を分散液に加え超音波処理を行い、それぞれポリスチレンディッシュに薄層コートしたディッシュ上で (SW dish 及び MW dish)、骨芽細胞用細胞 (Saos-2) を培養し、播種後 1 時間後、6 時間後の接着細胞数、さらに 3 日後、6 日後の細胞増殖を Culture dish 上での培養細胞と比較した。また、それぞれのディッシュ上で 4 日間培養した細胞中の生細胞の割合を比較した。

CNT 上での長期的影響を評価するため、CNT dish 上で約 4 週間 CNT ディッシュ上で継代・培養を行った細胞の各ディッシュ上での形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) で比較し、さらにそれらの細胞をすべて Culture dish に播種し、細胞形態を SEM で比較した。長期間 CNT 上で継代・培養を行うことによる活性の変化を比較するため、CNT ディッシュ上で継代・培養した細胞をそれぞれ Culture dish に播種し ALP 染色を行った。

シリコンラバー表面へ CNT をコートすることによる細胞反応性の変化を評価するため、シート状のシリコンラバー表面に SWCNT および MWCNT をそれぞれ 1cm² あたり 1 μ g、10 μ g コーティングし (SW1、SW10、MW1、および MW10)、表面構造の観察、表面粗さの測定、アルブミンの吸着試験、接触角の測定を行った。接触角の測定では培地に 4 時間浸漬し、浸漬前後の接触角の変化を比較した。それぞれのシート表面で細胞培養を行い 6 日後の増殖細胞数の比較、SEM での観察を行った。

C. 研究結果

細胞生存率は、チタン鉄と比較してニッケルで低い傾向が認められた。コントロールおよび 10 μ m 以上の大きさのチタンと比較して、10 μ m 以下のチタンや CNT と混和した好中球の細胞生存率は低い傾向が認められた。針状チタンは球状チタンと比較して細胞生存率が低い傾向が認められた (図 1、2、3)。活性酸素産生量は、コントロールおよび 10 μ m 以上の大きさのチタンと比較して、10 μ m 以下のチタンやほかの材料と混和し多好中球で高い傾向が認められた。針状チタンは球状チタンと比較して活性酸素

産生量が高い傾向が認められた (図4、5、6)。サイトカイン放出量は、コントロールおよび $10\mu\text{m}$ 以上の大きさのチタンと比較して、 $10\mu\text{m}$ 以下のチタンやほかの材料と混和した好中球で $\text{TNF-}\alpha$ の放出量は高い傾向が認められた。針状チタンは球状チタンと比較して $\text{TNF-}\alpha$ の放出量は高い傾向が認められた (図7、8、9)。

CNT の細胞に及ぼす影響の評価では、作製した CNT dish の表面は CNT でほぼ均一に覆われていた。骨芽細胞用細胞 (Saos-2) による接着試験では、播種して1時間後の接着細胞数は Culture dish で最も多く、SW dish はその半分程度であったが、6時間後ではほぼ同程度の接着を認めた (図10)。増殖細胞数の比較では、3日目では Culture dish での増殖数が最も多く、SW dish、MW dish ではほぼ同程度であったが、6日目では SW dish での増殖数が最も多かった (図11)。生細胞の割合はすべてのディッシュ上で 97% 以上であった。

それぞれの CNT ディッシュ上で継代・培養を続けた細胞を SEM で観察したところ、Culture dish 上での細胞に比べ、MW dish 上での細胞の方がより偽足が伸展しているのが観察された (図12)。また、それぞれの細胞をすべて Culture dish 上に継代し、細胞形態の変化を観察したが、形態に大きな差は認められなかった (図13)。それぞれのディッシュ上で継代を続けた細胞を Culture dish 上に播種した状態で ALP 染色を行ったところ、ほぼ同様に染色されていた (図14)。

シリコンラバー上に CNT をコートしたシート (SW10、MW10) 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 CNT が網目状に覆っているのが観察された (図15)。また、表面粗さを測定したところ、コートした CNT の量が増加するにつれ、平均粗さ (Ra) が増加していた。SWCNT と MWCNT 間では差はほとんど認められなかった (図16)。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蛍光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 (図17) また、SWCNTs と比較して MWCNTs の方が吸着量が多かった。接触角を測定したところ、すべてのシートで培地に浸漬することで接触角の低下が認められた (図18)。シート状の

シリコンラバー表面に CNT をコーティングし、シート表面で6日間細胞培養を行った結果、コートしていないシリコン上では殆ど細胞が認められなかったのに対し、CNT をコートしたシート上では細胞増殖数の著しい増加を認めた (図19)。特に、SWCNT をコートしたもので良好な細胞増殖が観察された。また、MW をコートしたシリコン上ではシート上の細胞の偽足が伸展しているのが観察された (図20)。

D. 考察

一般に好中球は種々の刺激に対して炎症反応を起こし活性酸素やサイトカインを放出し、また貪食やアポトーシスを起こすことが知られている。そこで本研究ではヒト好中球の機能を用いて微粒子の生体親和性や為害性について研究した。今回用いた金属のうち、ニッケルは最も細胞為害性が高いとされている。本研究においてもニッケルと混和した好中球の細胞生存率はサイズに関係なく低いことから、材料は生体親和性に影響を与える因子であると考えられた。細胞生存率の結果から $10\mu\text{m}$ 以下の微粒子は細胞為害性が高く、活性酸素産生量、サイトカイン放出量から好中球は $10\mu\text{m}$ 以下の微粒子に対して炎症反応を起こしていることが示唆された。これは好中球の大きさは約 $10\mu\text{m}$ であり細胞の大きさよりも小さい微粒子に対して好中球が反応していることを示している。このことから微粒子のサイズは生体親和性に影響する因子であることが示唆された。

生体親和性が高いとされているチタンにおいて、針状と球状と比較すると針状の方が細胞生存率が低く、活性酸素産生量、サイトカイン放出量が高いことから、同じ材料、サイズであっても形態が生体親和性に影響することが示唆された。CNT、CNR は好中球よりも小さく、単体では正常細胞に影響を与えることが考えられるため、バイオ応用を考える際には単体利用ではなく複合体としての応用など何らかの工夫を行う必要があると考えられた。

CNT 自体が細胞に及ぼす影響の評価では、CNT ディッシュ上で良好な増殖を示したことから CNT が細胞に対して強い毒性は示さないということがわかった。これは、長期的に CNT 上で培養することにおいても同様であり、CNT 上で長期的に細胞を継代した細胞を通常の条件に戻し培養したもので形態

や活性に変化がないことから、CNT 上での培養は細胞の形態や機能には大きな変化を残さないことが示唆された。

また、シリコンシートでの培養の結果より、CNT をシリコンの表面に使用することで、細胞増殖性を大きく向上させることができるということが明らかになった。MW をコートしたシート上では、SW と比べ細胞増殖性は大きくなかったものの、偽足の進展した細胞を多く認めた。シリコンに CNT をコートすることによる細胞増殖性の向上に関わる直接の要因は明らかではないが、CNT をコートすることによる粗さの増加や CNT に培地中のアルブミンなどのタンパク質が吸着することによる細胞接着性の向上などが考えられる。

CNT を用いることでシリコンの表面の細胞接着性を向上させることが明らかになり、CNT 上で細胞培養することでも細胞の機能や形態に大きな影響を及ぼさない可能性が示唆されたことから、今後これらを用いた生体再建材料や、CNT の特徴ある機能を持った人工臓器の開発などへの応用が可能と考えられる。

E. 結論

微粒子の生体親和性及び為害性は、材料、サイズ、形態に影響されることが示唆された。

CNT が長期的に細胞に及ぼす影響は少ないということが示唆された。また、CNT を表面に応用することでシリコンラバー上での細胞増殖を著しく向上させることが可能になった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Noriyuki Takashi, Fumio Watari, Yasunori Totsuka, Inflammatory Exudates Modulate the Function and Apoptosis of Neutrophils, *Oral Science International*, Vol.5: No.2: 122-130 (2008)
2. Makoto Matsuoka, Tsukasa Akasaka, Takeshi Hashimoto, Yasunori Totsuka and Fumio Watari, "Improvement in cell proliferation on silicone rubber by carbon nanotube coating", *Bio-Medical Materials and Engineering*, in press (2009)

2. 学会発表

1. 松岡真琴, 赤坂 司, 橋本 剛, 戸塚靖則, 亙理文夫, "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, 亙理文夫, "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, 亙理文夫, "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

4. Makoto Matsuoka, Tsukasa Akasaka, Takeshi Hashimoto, Yasunori Totsuka, Fumio Watari, "Cell adhesion to CNT coated silicone rubber", *International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes*, Abstract P30, Sapporo, Japan, 2008

5. 松岡真琴, 赤坂司, 戸塚靖則, 亙理文夫, "シリコンラバー上での細胞接着", 平成 20 年度日本歯科理工学会 北海道・東北支部夏期セミナー 要旨集 P3 北海道、千歳市、2008

6. 松岡真琴, 赤坂司, 戸塚靖則, 亙理文夫, "高い細胞接着性と電気伝導性を併せ持つ生体再建材料の開発", 平成 20 年度秋季第 52 回日本歯科理工学会学術講演会 講演集 P358 大阪 2008

7. Makoto Matsuoka, Tsukasa Akasaka, Yasunori Totsuka, Fumio Watari, "Cell proliferation on flexible and electroconductive CNT coated silicone rubber", *Joint international meeting: 214th Meeting of ECS — The Electrochemical Society*, 2008 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan, Abstract CD-ROM, Honolulu, Hawaii, 2008

8. 松岡真琴, 赤坂司, 橋本剛, 戸塚靖則, 亙理文夫, "カーボンナノチューブディッシュ上での細胞培養", 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 5 回研究成果発表会 要旨集、P17-18、北海道、苫小牧、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

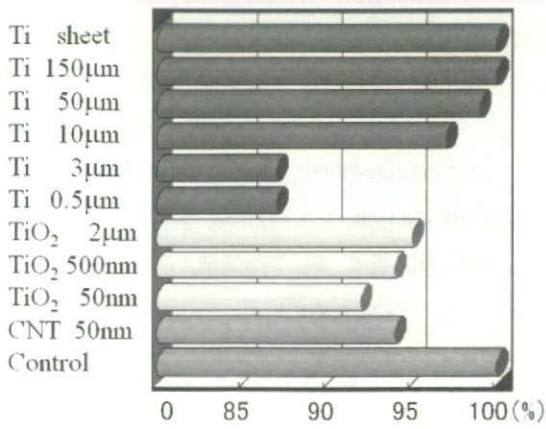


図1 細胞生存率 (サイズによる比較)

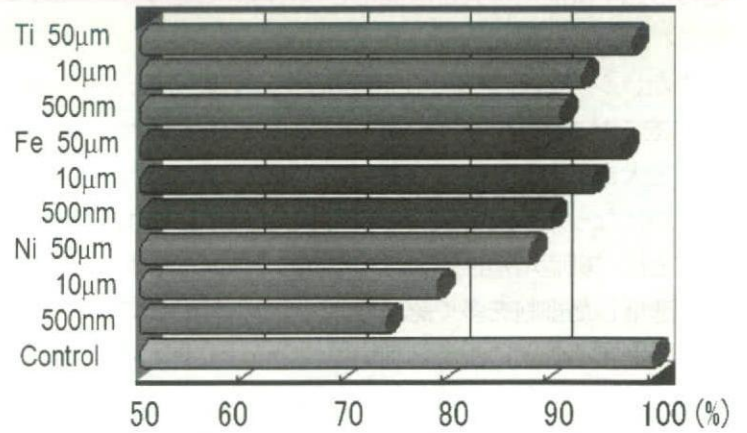


図2 細胞生存率 (材料による比較)

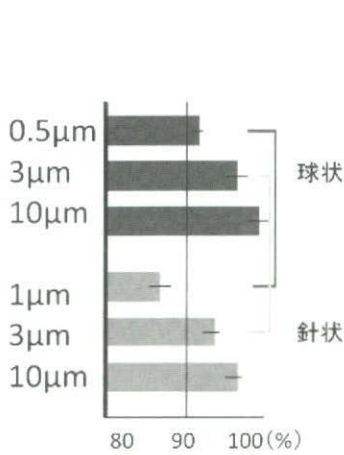


図3 細胞生存率
(チタンの形状による比較)

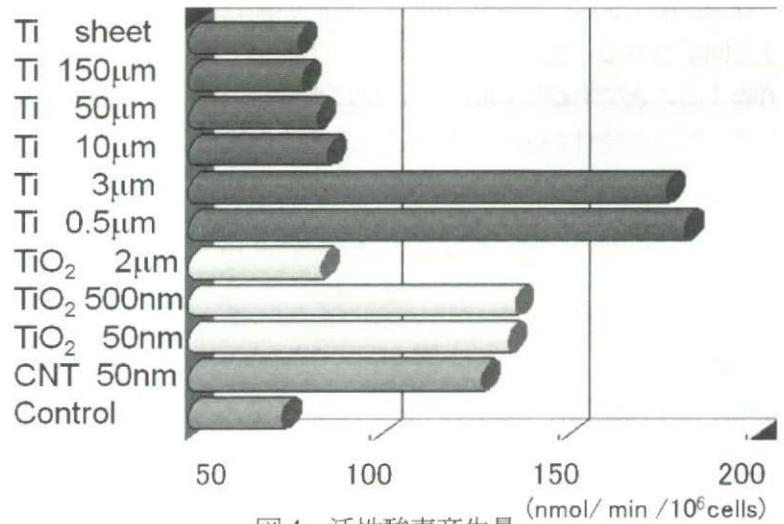


図4 活性酸素産生量
(サイズによる比較)

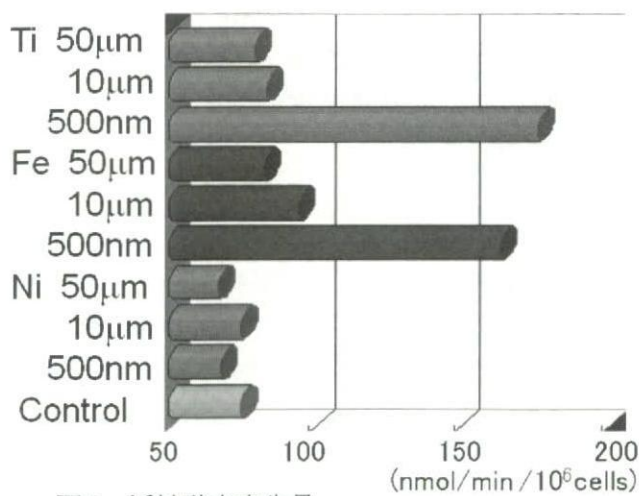


図5 活性酸素産生量
(材料による比較)

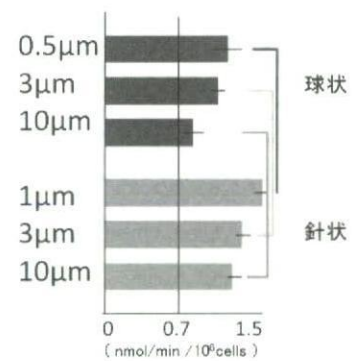


図6 活性酸素産生量
(チタンの形状による比較)

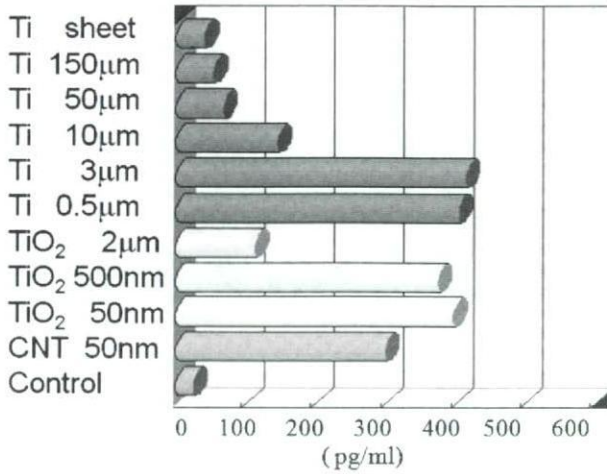


図7 TNF-α産生量
(サイズによる比較)

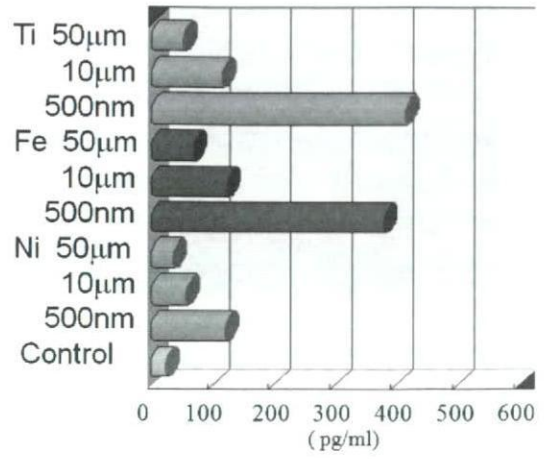


図8 TNF-α産生量
(材料による比較)

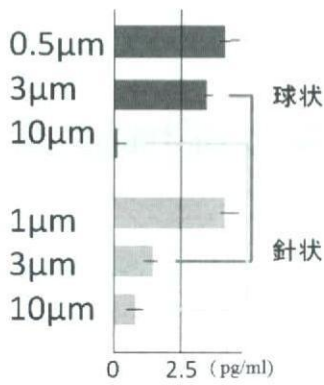


図9 TNF-α産生量
(チタンの形状による比較)

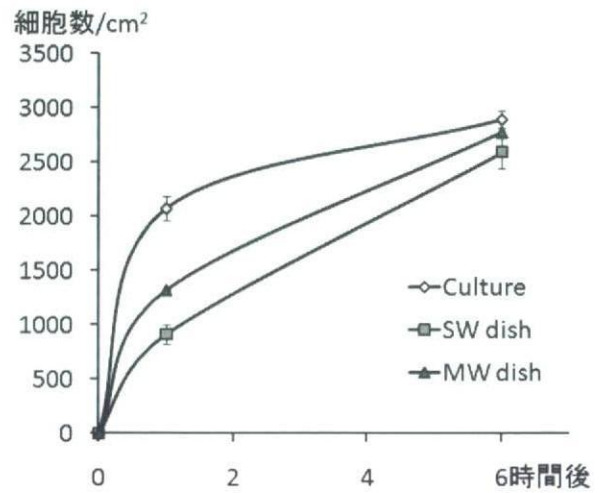


図10 接着細胞数 (1×10^5 /dish で播種)

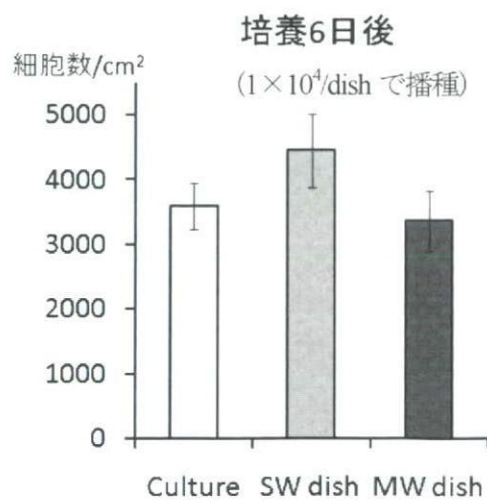
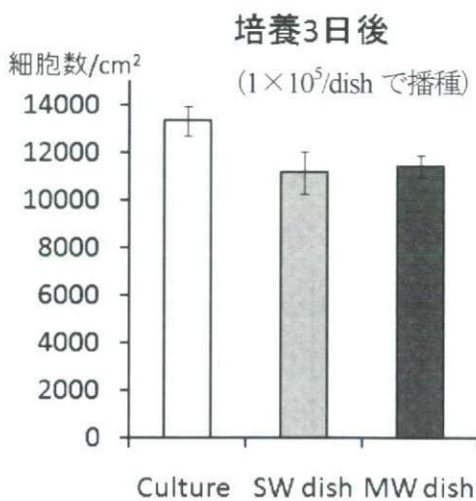


図11 播種3日後と6日後の増殖細胞数



図12 各ディッシュ上で継代・培養した細胞のSEM観察像



図13 各ディッシュ上で継代・培養した細胞を Culture dish に播種し直した後のSEM観察像



図14 各ディッシュ上で継代・培養した細胞を Culture dish に播種し直した後のALP染色像

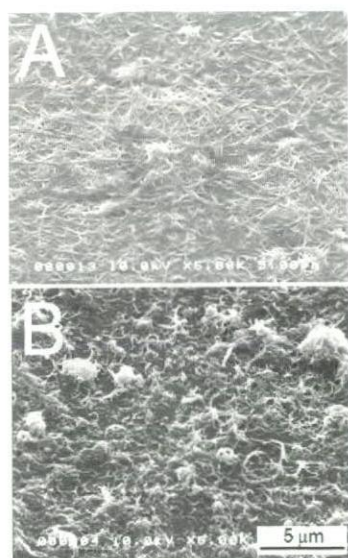


図15 CNTをコートしたシリコンラバーの表面構造。A ; SW10、B ; MW10。

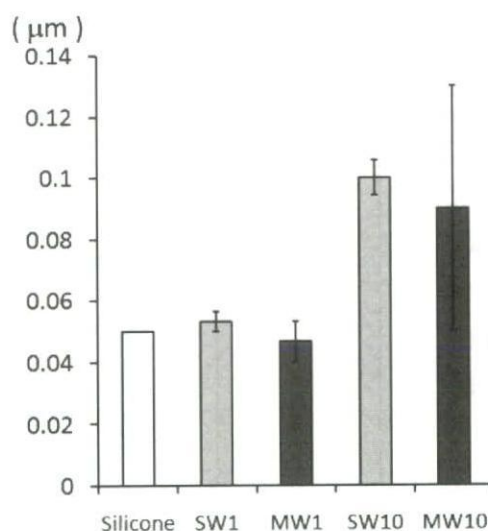


図16 CNTをコートしたシリコンラバーの表面粗さ (Ra)。

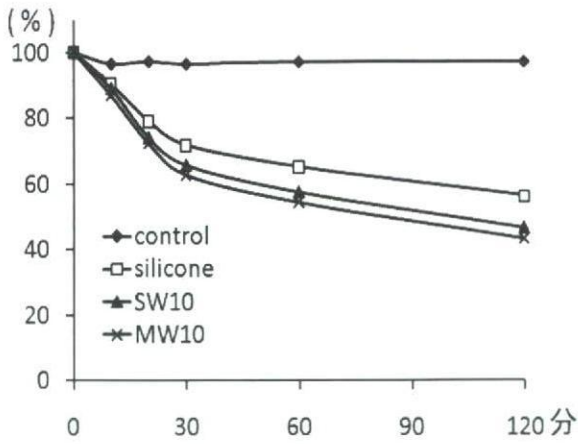


図 17 シリコンを浸漬した蛍光アルブミン溶液の蛍光強度の変化

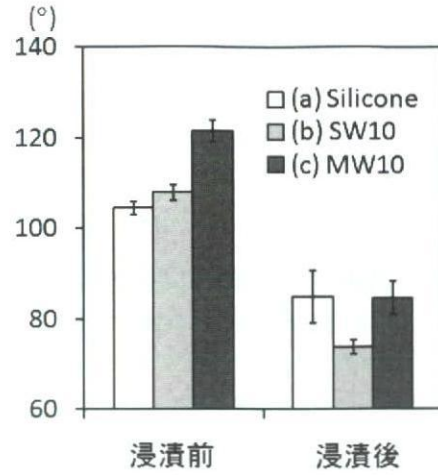


図 18 培地に浸漬する前と後の接触角の変化

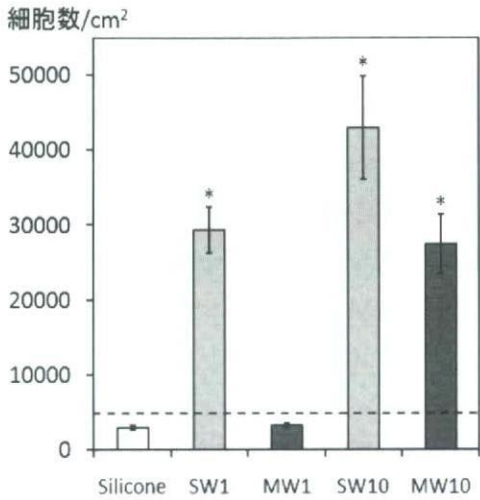


図 19 各シート上での増殖細胞数。

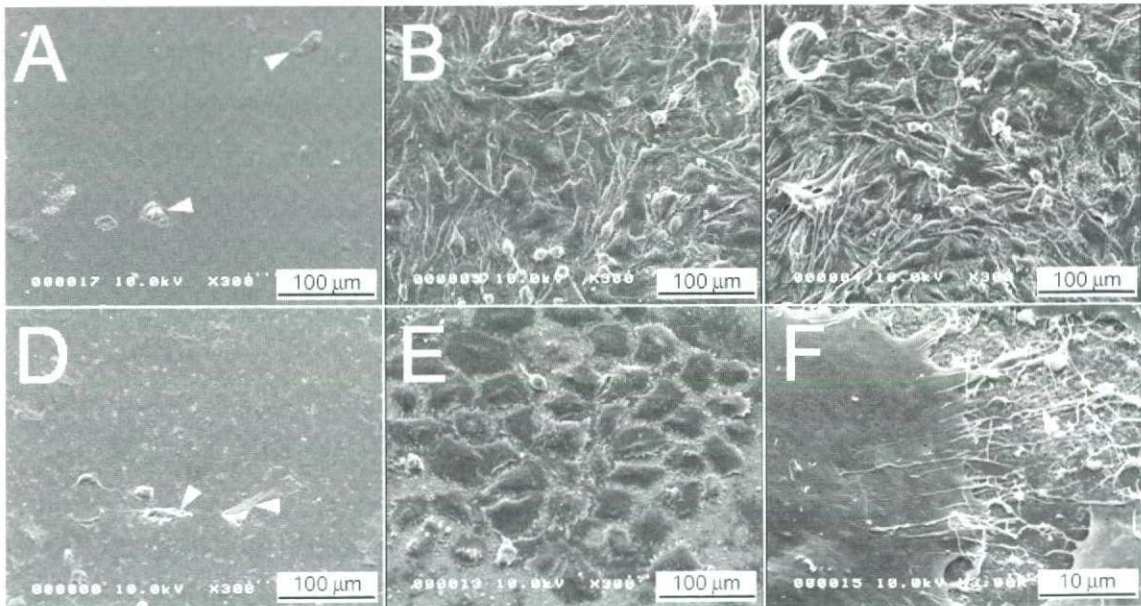


図 20 各シート上で6日間培養した細胞のSEM写真。A ; CNT をコートしていないシリコンラバー、B ; SW1、C ; SW10、D ; MW1、E ; MW10、F ; E の拡大図。

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 カーボンナノチューブ(CNTs)は、化学的安定性、機械的強度、電気的特性に優れ、生体適合性も高いことが推測されており、多方面での応用が期待されている。そこで我々は、CNTsをコラーゲンコートディッシュ表面にコートした新たな細胞培養担体を開発し、その培養特性を評価した。さらに同ディッシュの作製技術を歯科用インプラントで主に用いられるチタンに応用し、チタンへの細胞付着性を向上させることを目的とし研究を行った。精製多層CNTs(MWCNTs)に水酸基を付与し、100ppmとなるようコール酸ナトリウム水溶液に均一に分散し、コラーゲンコートディッシュに3時間作用させ、MWCNTsを凝集体なく均一にコートしたMWCNTコートディッシュを得た。得られたディッシュは、高い透光性を持ち、従来のCNTsを用いた担体では困難であった光学顕微鏡観察が可能となった。また同ディッシュ上では、良好な細胞増殖、細胞活性が認められた。細胞付着性試験では、通常、細胞が剥離するtrypsin-EDTA処理でもMWCNTコートディッシュ上の細胞は残存していた。また、鏡面研磨されたチタン板をアミノ化し、アテロコラーゲンを付着させ、MWCNTコートディッシュの作製法と同条件でMWCNTs分散液を作用させたところ、MWCNTsは凝集体なく均一にコートされた(MWCNTコートチタン板)。MWCNTsはコラーゲンを介してチタン表面に強くコートされており、このコーティング層に厚みは150-300nmと見積もられた。MWCNTコートチタン板の表面粗さは、MWCNTsにより有意に増加した。MWCNTコートチタン板にもdish同様、良好な細胞増殖と高い細胞付着性が認められた。さらにチタン棒を用いMWCNTsコートチタン棒を作製し、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。このMWCNTコートディッシュとチタン板の付着性は、細胞とMWCNTsの機械的結合だけでなく、MWCNTsによる比表面積の増大やMWCNTsのカルボキシル化が細胞接着因子をより多くMWCNTsに吸着させたことに因ると推測された。

以上のことから、MWCNTコートディッシュの新たな細胞培養用担体としての可能性や、MWCNTコートチタン板の特性から、細胞接着能を有した表面を持つチタン製インプラントの開発に応用できる可能性が示唆された。

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 μm 程のグラフェンシートを筒状に丸めた構造をとり、化学的安定性、機械的強度、電気的特性だけでなく、生物学的特徴などにも優れ、多方面での応用が期待されているナノ材料である。最近では CNTs の高い細胞親和性の報告 (Aoki N, et al. J.Biomed.Nanotechnol. 2005; 1(4)) や、コラーゲンとの親和性 (Rebecca A. MacDonald, et al. J Biomed Mater Res A. 2005; 74(A), 3(1)) など報告されている。

既存の CNTs を用いた細胞培養担体が膜状の CNTs であり、CNTs 自体の黒色によって透過性がなく細胞観察は SEM を用いることがほとんどであること、そして、その製作過程も煩雑なものが多いことから、我々は、化学的に安定で水溶液に対し分散性の悪い CNTs の分散性を高め、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に CNTs を付着させるという簡便な作製方法にて、新たな特徴的な細胞培養担体の開発を目的とし、研究を行った。

(平成 19 年度報告)

一方、現在の歯科用インプラントは、インプラント体を埋入法として、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。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、オパ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、製造過程が煩雑となっている。

また、歯科用インプラントの研究で歯根膜付着型インプラントも非常に興味深い。従来の歯科用インプラントは咬合圧緩衝や咀嚼センサーなどの役割を果たす歯根膜が無い。チタン表面を改質したものやハイドロキシアパタイトなどを付着させたものなど歯科用インプラントの表面の改質の研究がなされているが、すべての研究において、歯根膜細胞の強固な付着や安定した増殖がインプラント表面には必要

である。

そこで、これまで開発してきた MWCNT コートディッシュの作製技法を応用して、MWCNTs を使用した新たな歯科用インプラントの表面改質の開発を目的とし、研究を行った。(平成 19 年度および 20 年度報告)

B. 研究方法

B-1 新たな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 $500^{\circ}\text{C} \times 90$ 分酸化処理後、塩酸洗浄し精製した。さらに、分散性を高めるために MWCNTs にカルボキシル基を付与した (H. Peng, et al., JACS, 125, 2006)。
 - b) MWCNTs の分散性をより高めるため、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 $1 \sim 1000 \text{pm}$ 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 ($\phi 35 \text{mm}$, IWAKI) に MWCNTs 分散液 2cc を注ぎ、 $1 \sim 6$ 時間静置にして MWCNTs をディッシュ表面に付着させ、洗浄・自然乾燥した。(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 ($\phi 25 \text{mm}$, 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. MWCNT-コートディッシュの可視的検討
3. 細胞活性、細胞観察、細胞付着性の検討
 - a) MWCNT コートカバーガラス表面に、マウス線維芽細胞様細胞 (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, GIBCOTM) + 10% FBS (biowest) を用い、 37°C 、5% CO_2 にて $1 \sim 3$ 日間培養した。
 - b) 経時的 (培養 24, 48, 72 時間) に①細胞形態観

察②細胞活性評価③細胞付着性を確認した。

①細胞形態観察：前述の光学顕微鏡観察、および通例に従い固定・臨界点乾燥後 SEM 観察の2種行った。

②細胞活性評価（培養後、ギムザ染色 (Giemsa's solution(MERCK)) および②細胞形態観察

i) Alamer blue (BIOSOURCE) を用いた比色測定： $\lambda=570\text{nm}$ と $\lambda=600\text{nm}$ の吸光度差を測定し生細胞を評価した。

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。

③細胞付着性：コンプレントになるまで細胞培養し、0.1%トリプシン EDTA と 0.02%トリプシン EDTA を 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、経時的にディッシュ基質上に残存している細胞数の変化を観察した。

B-2 インプラント表面改質の研究

1. チタン表面へのコラーゲンコーティングの検討

a) チタン板 (99.5%, 1mm 厚, ニラコ) を emery paper にて鏡面研磨し、 $16\times 5\text{mm}$ に切断する (以降、研磨 Ti 板と呼ぶ)。

b) 研磨 Ti 板を 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 時間作用させた (以降、コラーゲンコート Ti 板と呼ぶ)。

c) 得られたコラーゲンコート Ti 板に 100ppm MWCNTs 分散液を 3 時間作用させた (以降、MWCNT コート Ti 板と呼ぶ)。

d) 各チタン板の表面を、SEM にて観察した。

e) MWCNT コート Ti 板の作製方法を用い、カバーガラスに MWCNTs を付着させ (MWCNT コートカバーガラス)、機械的破断面を SEM にて確認し、コラーゲンの厚みを観察した。

f) 表面粗さ測定器 (Surfcom 130A; 東京精密, 東京) にて表面粗さ (Ra)、断面粗さを測定した。

2. MWCNT コートチタン板上での細胞培養

a) MWCNT コート Ti 板を $\phi 35\text{mm}$ のアズノールシャーレの中央にコート面が上になるように

置き、マウス線維芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を $1\times 10^5\text{cells/dish}$ となるよう播種した。培地は $\alpha\text{-MEM}$ (Minimum Essential Medium, GIBCO™) + 10% FBS (biowest) を用い、 37°C 、5% CO_2 にて 1~3 日間培養およびコンプレント培養した。

対照は研磨 Ti 板、コラーゲンコート Ti 板とした。

b) 経時的 (培養 24, 48, 72 時間) に①細胞形態観察②細胞活性評価③細胞付着性の確認した。

①細胞形態観察：各チタン板を通例に従い固定・臨界点乾燥後 SEM 観察を行った。

②細胞活性評価：細胞質増殖率にて評価した。SEM 観察にて無作為に 5 カ所選出し細胞数をカウントし平均を求め、チタン板上の細胞数を算出した。培養 24 時間の細胞数を 100 とし、経時的に細胞増殖を求めた。

③細胞付着性：コンプレントになるまで細胞培養し、0.02%トリプシン EDTA を 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、トリプシン EDTA 作用 10 分後にディッシュ基質上に残存している細胞数を観察、カウントした。

3. 動物実験における骨再生の検討

a) 用いた試料は Ti 板の代わりにラットの頭蓋に埋入し易い Ti 線を用いた。各 Ti 線を研磨 Ti 線、コラーゲンコート Ti 線、MWCNT コート Ti 線と呼ぶ。

b) 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。

c) 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 $130\mu\text{m}$ 厚の組織標本作製した。

d) 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たはいるものの、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検討結果

a) 研磨 Ti 板はほぼ平滑であり、collagen-coated Ti 板は collagen の凝集体がやや認められたが、研磨 Ti 板と同様にほぼ平滑であった。

MWCNT-coated Ti 板表面は、MWCNTs が均一に凝集体なくコートされていた。 (Fig.8)。

b) MWCNT コートカバーガラス破断面像から、collagen の厚みは約 150-300nm で、その表面には MWCNTs が一層でコートされていることが確認された (Fig.9)。

c) MWCNT コート Ti 板の表面平均粗さは、 $0.13 \pm 0.01 \mu\text{m}$ と有意に他のチタン板より粗造であり (Fig.10-1)、断面粗さも他のチタン板よりも粗造であることが確認された (Fig.10-2)。

2. MWCNT コート Ti 板上での細胞培養結果

a) MWCNT-coated Ti 板上の細胞は、初期の段階で他のチタン板上の細胞よりやや小さく、細長い、時間の経過とともに、伸展が増した (Fig.11)。

b) 一部の E1 細胞の偽足先端は、MWCNTs との機械的結合が認められたが、ほとんどの細胞の偽足先端は、MWCNTs に付着していた (Fig.12)。

c) MWCNT コート Ti 上の E1 細胞は、他の 2 種の Ti 板と比較してやや低い細胞増殖率を示した (Fig.13)。