

Table 4 Stages of clinical application of CNT-based biomaterials\*

Stage	Nature of the biomaterial	Site of use	Degree of in vivo exposure	Risk	Example of use
Stage 1	Composite	Topical	None/low	None/low	Artificial joints and interbody fusion materials
Stage 2	Particulate	Topical	Intermediate	Low/intermediate	DDSs and imaging for cancer treatment
Stage 3	Particulate	Topical	Intermediate	Low/intermediate	Regenerative medicine scaffolds and DDS for topical treatments
Stage 4**	Particulate	Systemic	High	High	DDSs and imaging that circulate via bloodstream

\*: Clinical application of CNTs to biomaterials should progress demonstrating the safety at each stage.

\*\* : The decision of proceed to Stage 4 requires extremely careful consideration.

## 図の説明

### 図 1

CNTsを生体材料に応用する研究の論文数が急増している。PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) (accessed 10 May 2013)で、“carbon nanotubes”と“biomaterials”をキーワードにして検索した結果の英語論文数の推移。CNTsを生体材料に応用する研究が、2005年ころから右肩上がりに増加し、ここ1、2年で世界的に激的な競争分野になってきたことを示す。このグラフは研究の増加を示すだけであり、この2つのキーワードで捉えきれない、CNTsを生体材料に応用する研究論文が他にも多数ある。

### 図 2

CNTsの生体応用は多岐にわたり、しかも癌治療や再生医療など現在の臨床医学において最重要課題となっている分野への応用が多い。

### 図 3

CNTsは本来相互に結合させることができない分子である抗癌剤などの薬物、モノクローナル抗体などのタンパクやペプチド、高分子ポリマーなどを同時に結合させるためのプラットフォームになる。このため、薬物運搬、生体膜通過、ターゲット部位での放出など、従来共存することができなかった複数の機能を、同時にCNTsに付加することができる。

### 図 4

MWCNTsはrhBMP-2とコラーゲンによる異所性骨形成を促進する。

a. マウス背筋内にrhBMP-2/コラーゲン/MWCNT複合体(上段)またはrhBMP-2/コラーゲン複合体(下段)を埋め込んで、2週間後に摘出した新生骨の軟X線写真。MWCNTsをコラーゲンに複合すると、MWCNTsを複合しない場合に比べて骨陰影が濃く、大きな骨が形成された。

b. 2週間後に形成された骨のBone mineral content (BMC)。MWCNTsをコラーゲンに複合すると、MWCNTsを複合しないものに比べて2週間後に形成された骨のBMCが有意に高値を示した。Error bars indicated standard deviation of the mean, n=8. Asterisk, P=0.016 between samples treated with carbon nanotubes and without them (unpaired Student's t test).

c. 2週間後に摘出した骨の組織像。コラーゲンのみに比べて、MWCNTsを複合した方が、骨梁が太く密であった。MWCNTsをコラーゲンに複合した組織には、MWCNTsが骨梁および骨髄に均一に取り込まれていた。骨梁内には、MWCNTs

が入り込み、骨基質と直接接触している像が認められた。Haematoxylin and eosin stain. Scale bars, 100mm.

#### 図 5

MWCNTs は骨修復を阻害しないで、修復された骨に取り込まれ、骨親和性が良好である。

a. マウスの下腿前面を切開して、脛骨骨幹部にドリルで孔を作成し、MWCNTs を埋め込んだ手術後 4 週間で摘出した脛骨の組織像。皮質骨と骨髓腔が正常に形成され、骨修復が完成していた。MWCNTs は形成された骨組織に取り込まれ、骨基質に封入されていた。Haematoxylin and eosin stain. Scale bar; 100mm.

b. 4 週間で修復された骨組織に取り込まれた MWCNTs の電子顕微鏡像。MWCNTs は骨基質のハイドロキシアパタイトと直接接触していた。Scale bar; 1mm.

#### 図 6

Pristine MWCNTs の細胞内への取り込みは、細胞や分散剤によって異なる。

a. ヒト悪性胸膜中皮腫細胞(MESO-1)、ヒト気管支上皮細胞(BEAS-2B)、ヒト神経芽細胞(IMR-32)にカーボンブラック(CB,  $\phi$  50 nm)と MWCNTs を暴露した 24 時間後の明視野像と位相差像を合わせた画像。MESO-1 細胞と BEAS-2B 細胞では CB と MWCNT とも細胞内に取り込まれ、各周辺部に局在しているのに対し、IMR-32 細胞では細胞に接着したが、細胞内には取り込まれなかった。BEAS-2B 細胞だけ CB と MWCNT は  $1 \mu\text{g/ml}$ 、それ以外は  $10 \mu\text{g/ml}$ 。Scale bar;  $50 \mu\text{m}$ .

b.異なる分散剤で分散させた MWCNTs を暴露させた時の 1, 24 時間での BEAS-2B 細胞への取り込み量の比較。フローサイトメーターで細胞内に取り込まれた MWCNTs による側方散乱光(SSC)で測定した。gelatin や 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC)で分散させた MWCNTs は継時的に取り込み量が増えたが、carboxymethyl cellulose (CMC) で分散させた MWCNTs は細胞にほとんど取り込まれなかった。

#### 図 7

Frustrated phagocytosis による発癌メカニズムの仮説を示すシエーマ。長い CNT は、細胞に取り込みきれずに酸化ストレスを生じ、炎症を誘導する。CNTs を吸い込むことにより、胸腔内で持続する炎症が長期間続くと、発癌する可能性が指摘されている。現在、CNTs の吸い込みにおける毒性研究では、持続する炎症が生じない吸入暴露の限界量の決定が課題になっている。

## 図 8

人体への安全性が立証されている刺青は、ナノサイズの純度の高いカーボンブラックであり、同じくナノサイズのカーボン粒子である CNTs の安全性を評価するための reference material として適切である。

- a. 2種類の刺青を乾燥させた Tattoo carbon black-1 (TCB-1) と Tattoo carbon black-2 (TCB-2) の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像。TCB-1 は直径約 30-50 nm のほぼ均一な粒子が集積しており、TCB-2 は直径約 50 nm のあまり均一でない粒子が集積していた。
- b. TCB-1、TCB-2、一般のカーボンブラックのラマン分析。TCB-1 および TCB-2 は、一般のカーボンブラックとほぼ同じ Raman shift を示した。D バンド: 乱層のアモルファス、G バンド: 黒鉛の結晶。
- c. TCB-1、TCB-2、一般のカーボンブラックの透過型電子顕微鏡 (TEM) 像。3者はほぼ同じ粒子形状を示した。

## 図 9

皮下組織に埋め込んだ MWCNTs に対する組織反応は、カーボンブラックに対する組織反応と酷似し、組織親和性が良好である。ヘマトキシリンエオジン染色。スケールバー: 20  $\mu$ m。TCB-1: Tattoo carbon black-1、TCB-2: Tattoo carbon black-2 (図 8 参照)。

- a. 6 週齢雄の ddY マウスの背部皮下組織にポケットを作り、生理食塩水と界面活性剤のみを 10  $\mu$ l 注入した陰性対照群 (NC) の組織像。1 週で皮下組織はほぼ修復され、4 週間後には完全に修復された。12 週間後、24 週間後も変化はなかった。
- b. MWCNT 溶液 (4.0 mg/ml) を 10  $\mu$ l 注入した皮下組織像。1 週で粒子のほとんどがマクロファージに取り込まれていた。周囲では線維芽細胞・好中球・リンパ球の集積を認め、弱い炎症反応を惹起していた。4 週間では、MWCNTs はマクロファージに取り込まれたままで、周囲の炎症反応は沈静化していた。MWCNTs を取り込んだマクロファージは多核巨細胞化し、異物肉芽腫の状態であった。12 週間後、24 週間後の組織像は、4 週間後と変化がなかった。
- c. TCB-1 溶液 (4.0mg/ml) を 10  $\mu$ l 注入した皮下組織像。1 週では、皮下組織でほとんどマクロファージに取り込まれ、MWCNT 群と同様に、線維芽細胞・好中球・リンパ球を認め、弱い炎症反応を惹起していた。4 週間後には、周囲の炎症反応は MWCNT 群と同様に沈静化していた。12 週間後、24 週間後も 4 週間後と同様の組織像であった。
- d. TCB-2 溶液 (4.0 mg/ml) を 10  $\mu$ l 注入した皮下組織像。1 週、4 週、12 週、24 週間後全て TCB-1 溶液と同様の組織像であった。
- e. zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC) 溶液 (4.0 mg/ml) を 10  $\mu$ l 注入した皮下組

織像。1 週後には線維芽細胞、好中球、リンパ球、形質細胞など多くの炎症細胞の集積を認め、広範囲に渡り強い炎症反応を惹起し、脂肪壊死や核塵 nuclear debris の形成を認めた。マクロファージの集積は認めなかった。4 週後にも、炎症は消退しつつあるものの炎症細胞を認め、炎症反応は継続していた。12 週後、24 週後では炎症反応は沈静化し、皮下組織が線維化を伴った癒痕組織として修復されていた。

#### 図 1 0

MWCNTs の細胞毒性は、カーボンブラックと同等以下である。TCB-1 : Tattoo carbon black-1、TCB-2 : Tattoo carbon black-2 (図 8 参照)。

a. コロニー形成試験における細胞毒性評価の適正度。V79 細胞 (チャイニーズハムスター肺由来 fibroblast、JCRB0603) のコロニー形成能は、陽性対照物質である ZDBC の濃度が高くなると低下し、コロニーの数を 50% 阻害する濃度 (IC50、基準値 : 1-4  $\mu\text{g/ml}$ ) が 1  $\mu\text{g/ml}$  から 2  $\mu\text{g/ml}$  の間であり、被験物質の細胞毒性作用を適正に評価していた。

b. コロニー形成試験の肉眼写真。培養液のみでの V79 細胞のコロニー形成と、MWCNT 溶液、TCB-1 溶液、TCB-2 溶液でのコロニー形成数を比較した。それぞれの溶液の濃度は、12.5、50、200、400、800、1600  $\mu\text{g/ml}$  である。

c. MWCNT 溶液、TCB-1 溶液、TCB-2 溶液の濃度とコロニー形成数。MWCNTs は濃度依存性にコロニー形成を阻害し、TCB-1 と TCB-2 も同様に濃度依存性にコロニー形成を阻害した。MWCNTs と TCB-1 のコロニー数は、200  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で MWCNTs が有意に多かった。MWCNTs と TCB-2 のコロニー数は、400  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で MWCNTs が有意に多かった。Error bars, s. d. n=6. Asterisk,  $p<0.001$ . Two asterisks,  $p=0.016$ .

#### 図 1 1

遺伝子導入発癌性 rasH2 マウスを用いた皮下埋め込み試験で、MWCNTs は発癌性が認められず、カーボンブラックと同等以下の発癌性であった。

a. rasH2 マウスの生存率。MWCNT 群のマウスは、26 週の時点で全て生存していた。カーボンブラック群では、22 週目に 1 匹が死亡し、26 週には 10 匹中 9 匹が生存していた。溶媒群は、26 週間すべてのマウスが生存していた。MNU 群では、13・14・17・22 週にそれぞれ 1 匹死亡し、26 週には 10 匹中 6 匹生存していた。

b. 発癌性マウスの臓器に生じた腫瘍の組織像。(A) MWCNT 群の 26 週生存したマウス 10 匹中 1 匹の脾臓に腫瘍 mass が認められた。inflammatory psudotumor で、新生物 neoplasm ではなかった。(B) 26 週生存したカーボンブラック群のマ

ウス 1 匹の肺に新生物が生じた。良性の adenoma と診断された。(C) MNU 群のマウス 10 匹全てに腫瘍が発生した。前胃腫瘍が 10 匹全てに発生し、扁平上皮の異常増殖を認めた (左上パネル)。皮膚腫瘍が 6 匹に発生した。大腿部に発生した皮膚悪性腫瘍を示した (右上パネル)。陰部腫瘍が 4 匹に発生した (左下パネル)。胸線腫瘍が 1 匹に発生した (右下パネル)。ヘマトキシリエオジン染色。スケールバー : 10  $\mu\text{m}$ 。

c. 26 週後の皮下埋め込み部位の組織像。(A) MWCNT 群は新生物を生じておらず、マクロファージが MWCNT particles を貪食して集積していた。周囲に好中球やリンパ球などの炎症細胞は、認められなかった。(B) カーボンブラック群も MWCNT 群と同様にマクロファージが粒子を貪食し、新生物を認めなかった。矢印 : MWCNTs、矢頭 : カーボンブラック。ヘマトキシリエオジン染色。スケールバー : 10  $\mu\text{m}$ 。

## 図 1 2

人工関節の摺動部材に応用するために、MWCNT を複合した超高分子量ポリエチレン ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE)を開発している。

- a. 人工関節摺動部に用いられる UHMWPE ソケット (左パネル) と MWCNT 複合 UHMWPE ソケット (右パネル)。
- b. CNT をソケット応用した人工関節の試作品。MWCNT 複合 UHMWPE は、摩耗しにくく破壊しにくいという、従来達成しえなかった特性を有するため、人工関節の摺動部材に適している。

## 図 1 3

脊椎固定材料に応用するために、MWCNTs を複合した polyetheretherketone (PEEK) 複合材を開発している。

- a. PEEK に MWCNTs を複合することにより、優れた機械的特性と骨親和性を有する革新的な脊椎固定材料になることを示すアイデアの図。(A) 表面の MWCNTs が骨親和性を付加する。(B) 内部に複合した MWCNTs が弾性率を制御する。
- b. (A) PEEK の脊椎固定ケージ (左パネル) と MWCNT 複合 PEEK ケージ (右パネル)。(B) CNT を応用した脊椎固定用ケージの試作品。

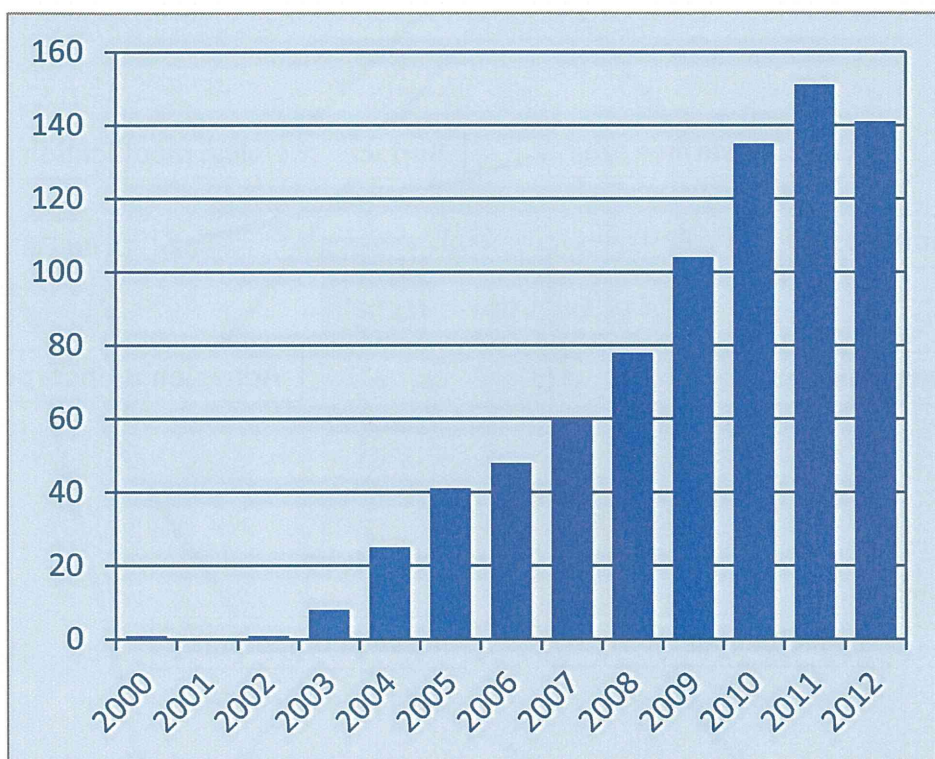


Figure 1

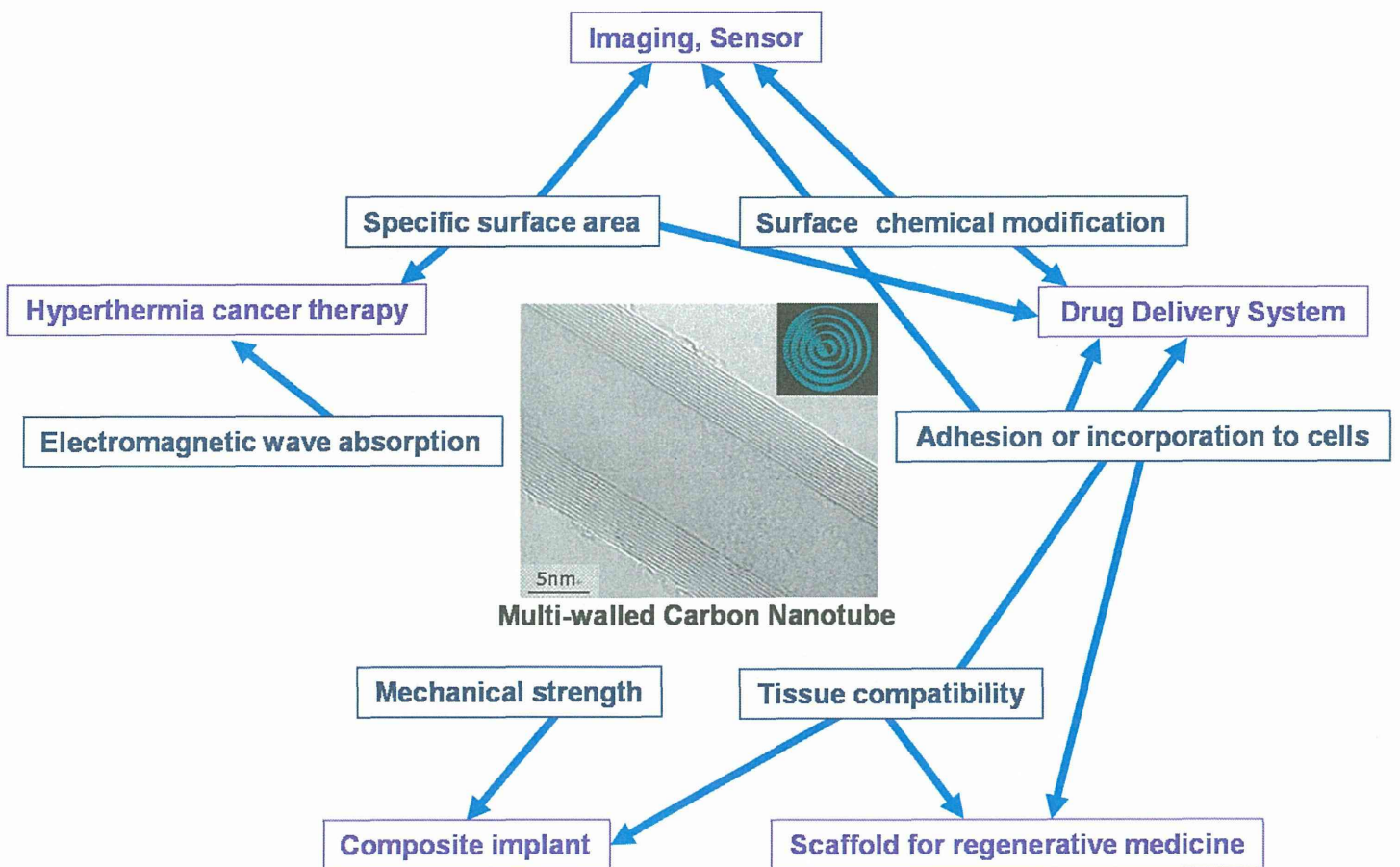
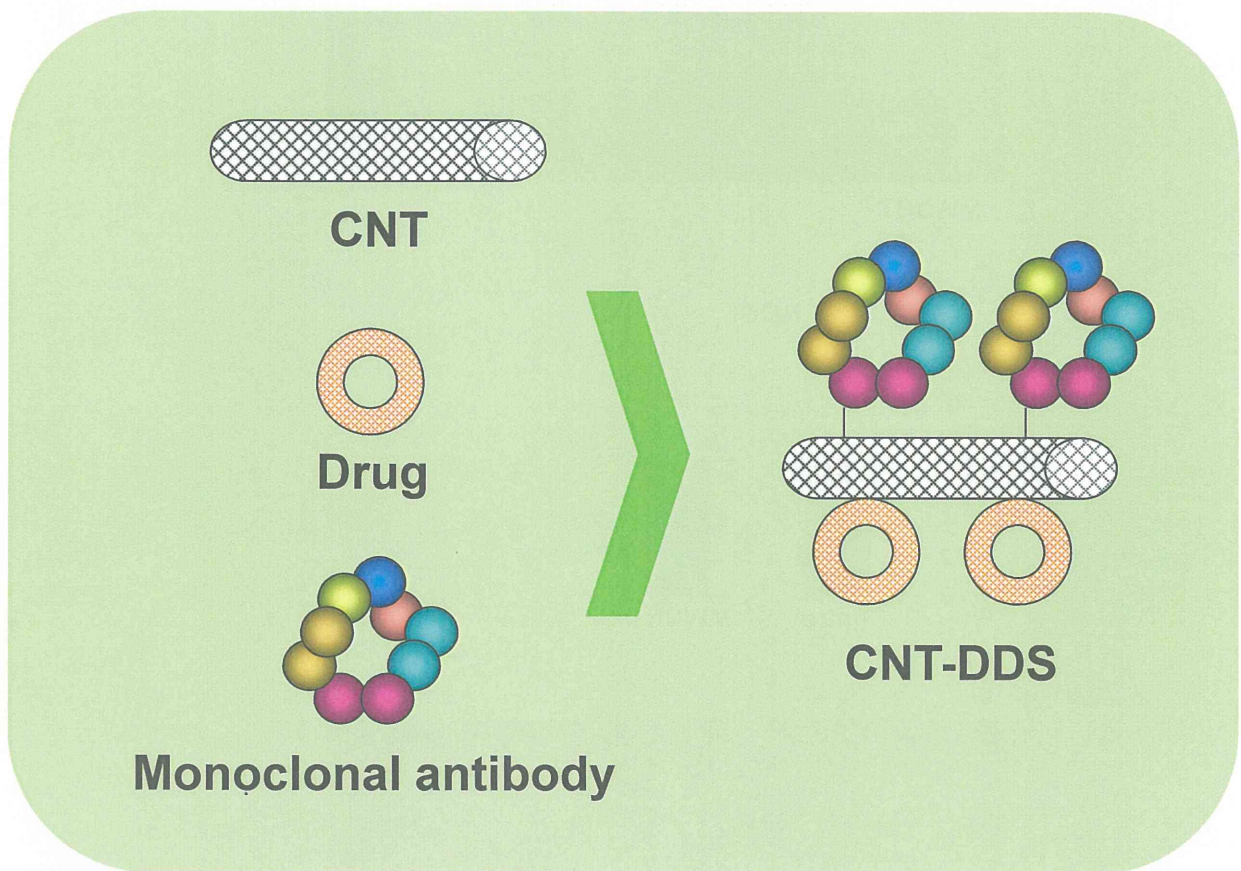


Figure 2





**Figure 3**

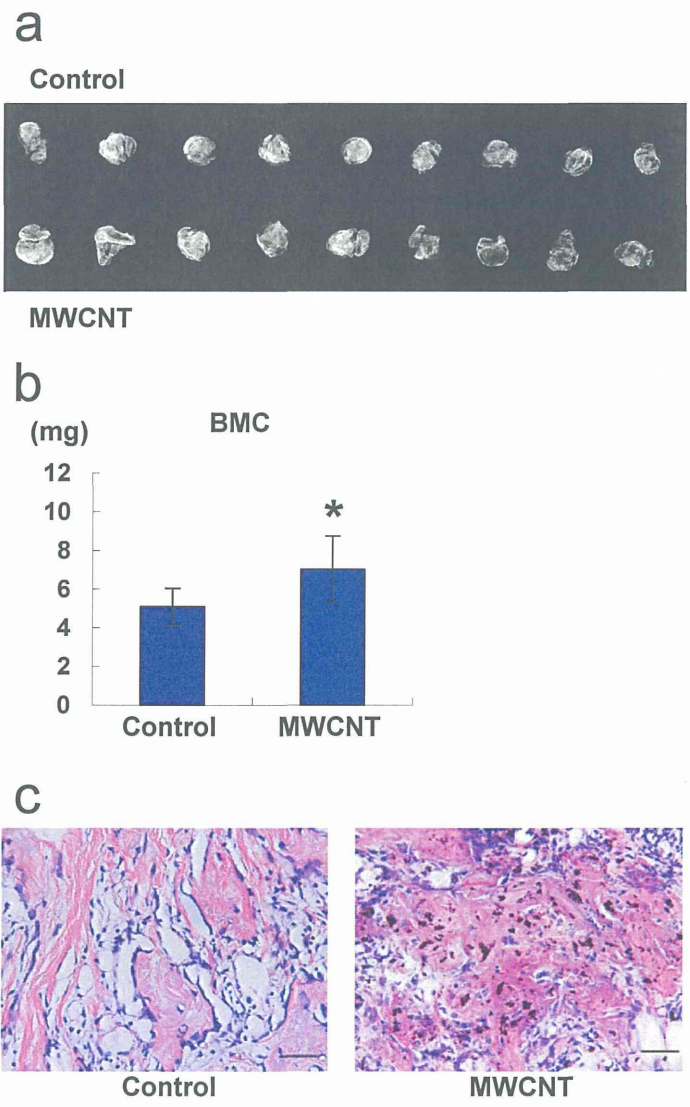
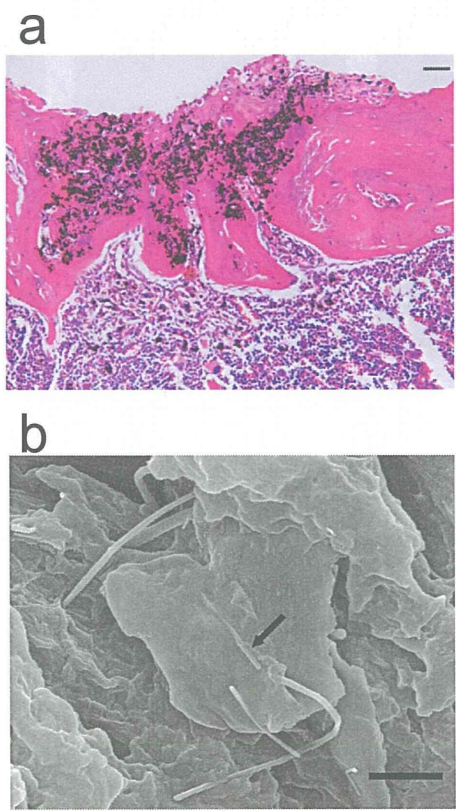
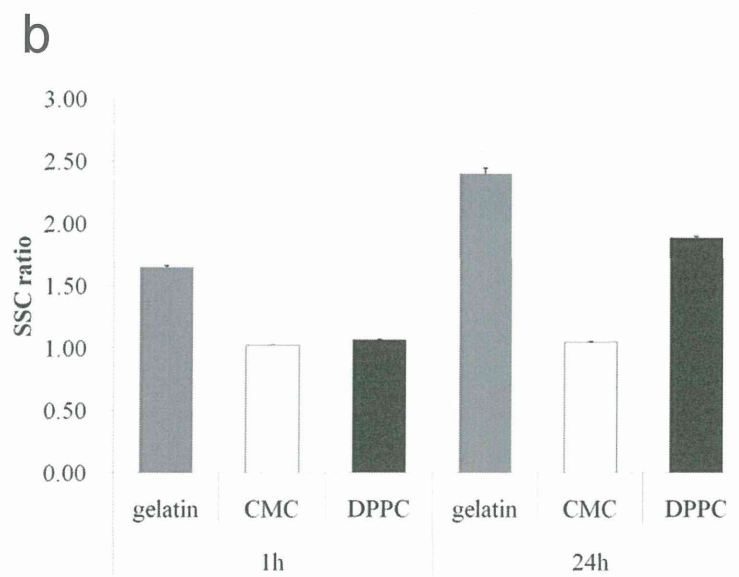
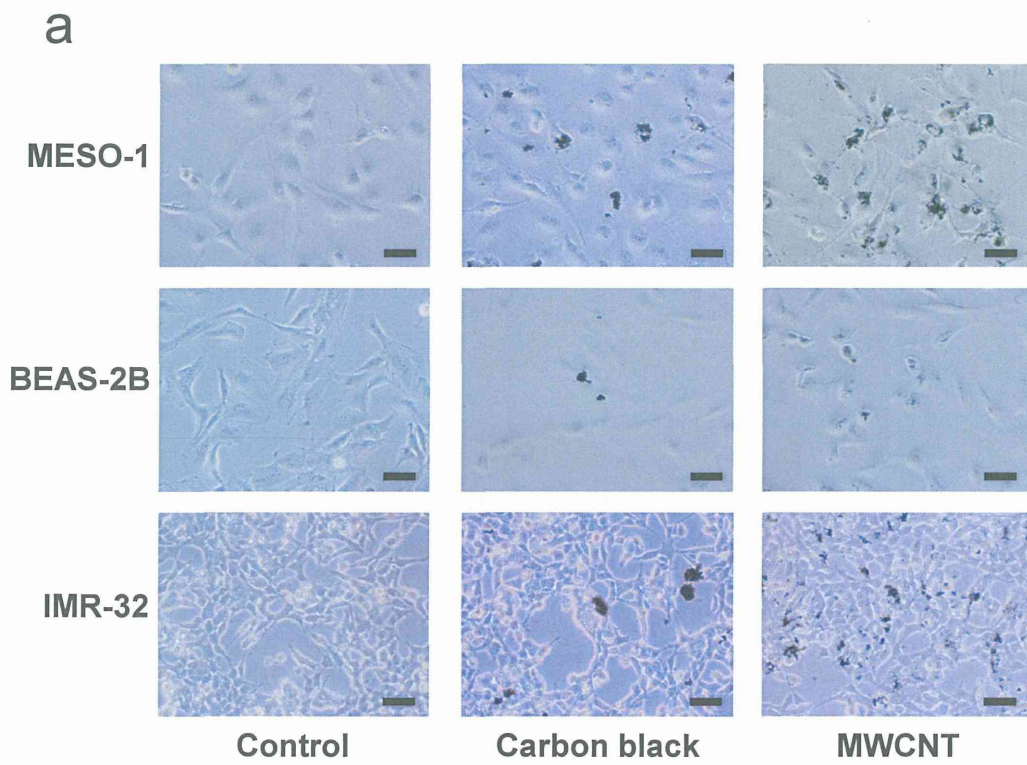


Figure 4



**Figure 5**



**Figure 6**

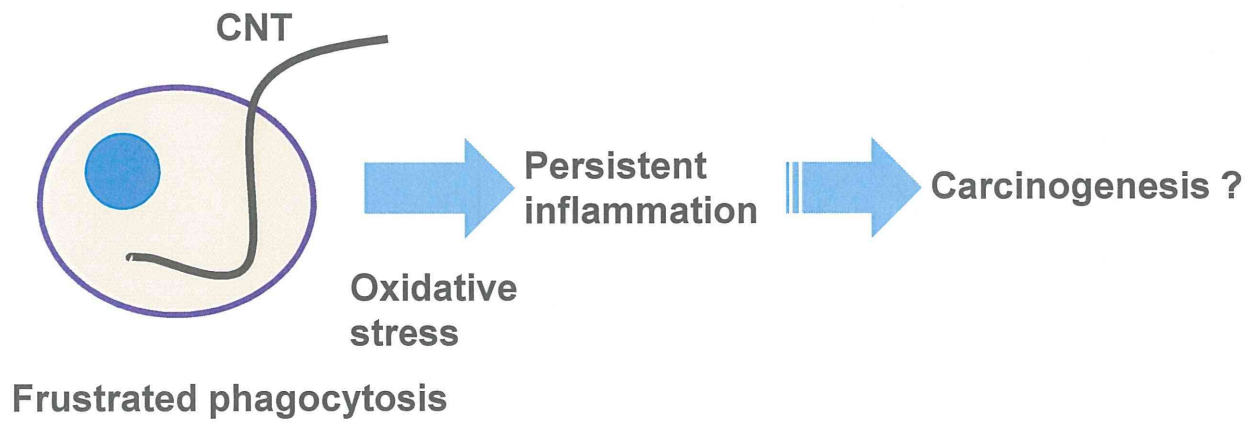
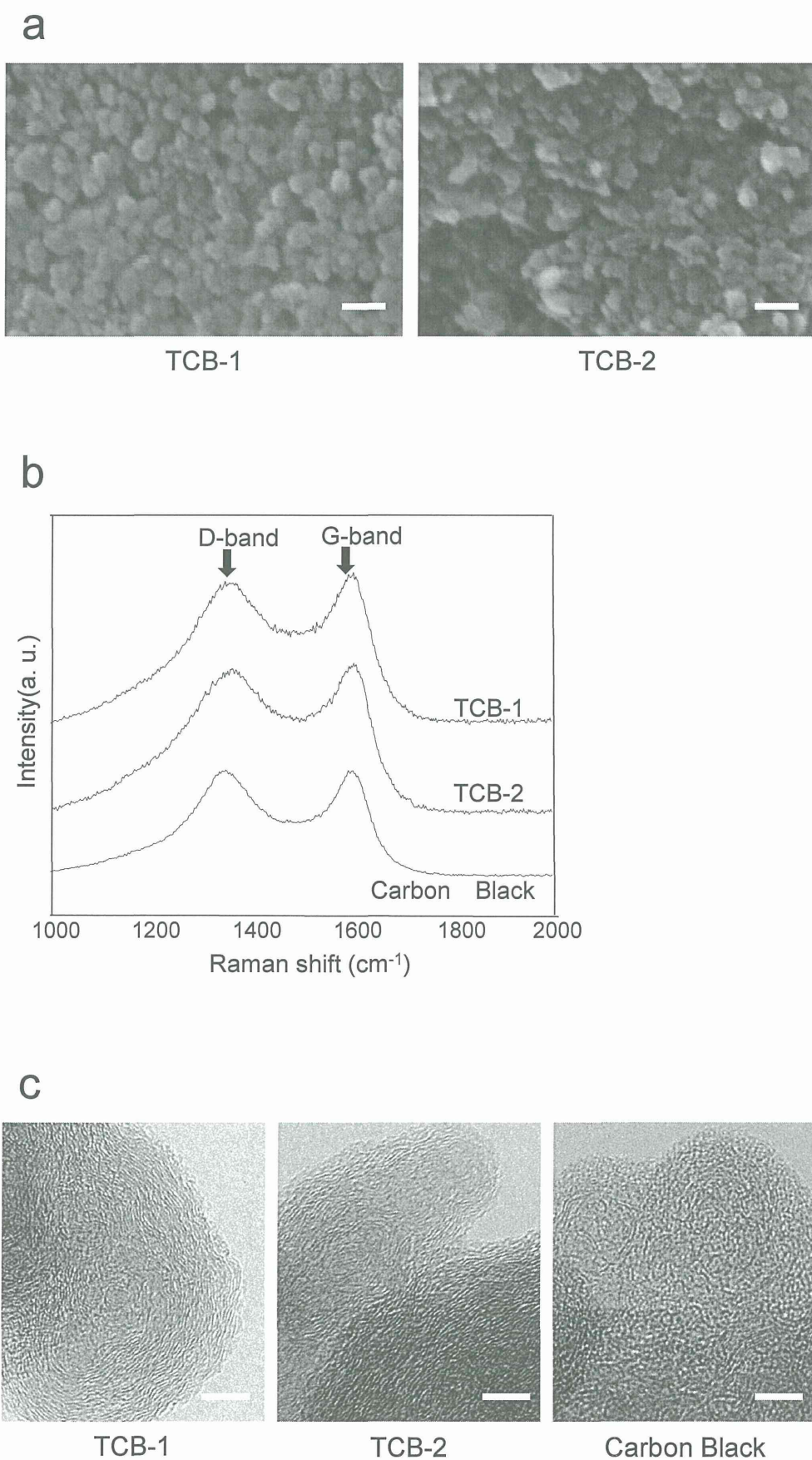
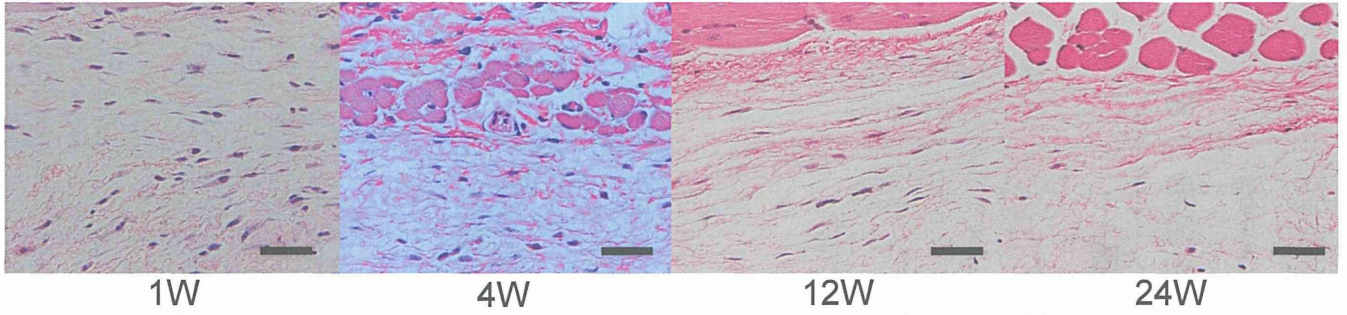


Figure 7

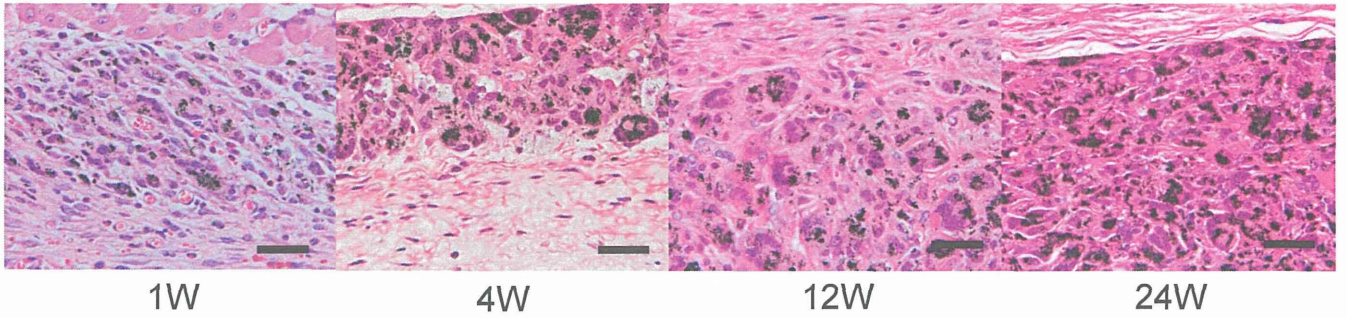


**Figure 8**

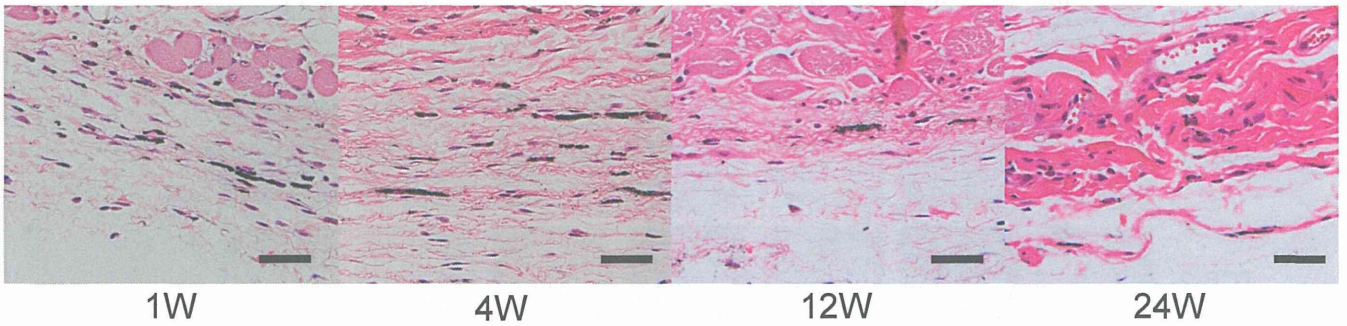
**a** negative control



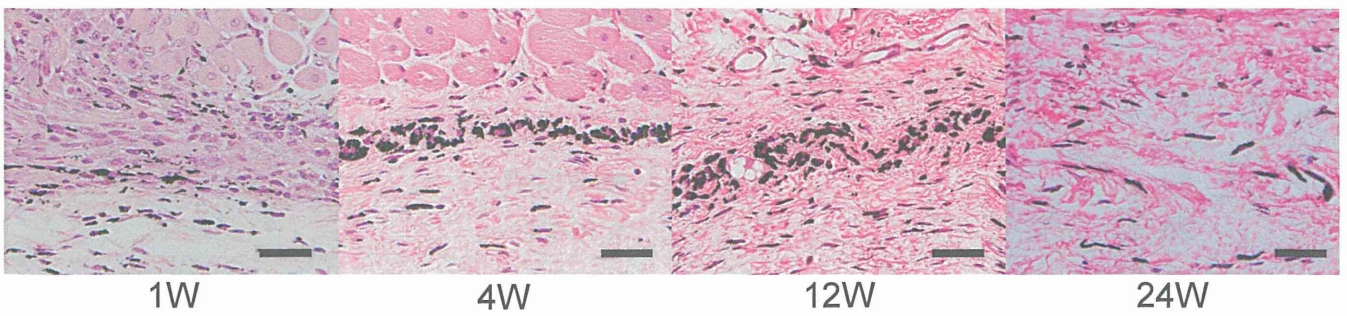
**b** MWCNT



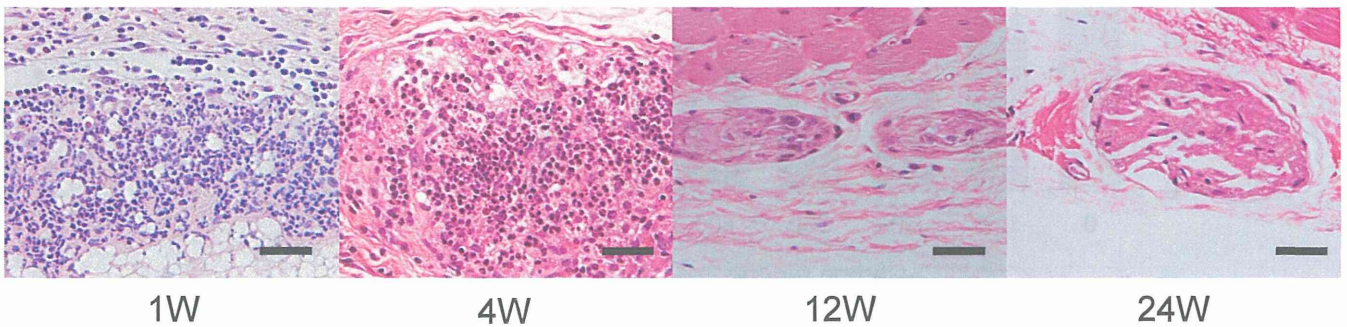
**c** TCB-1



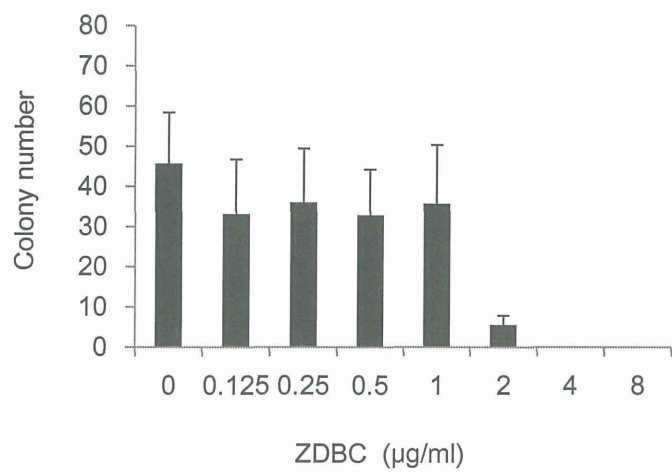
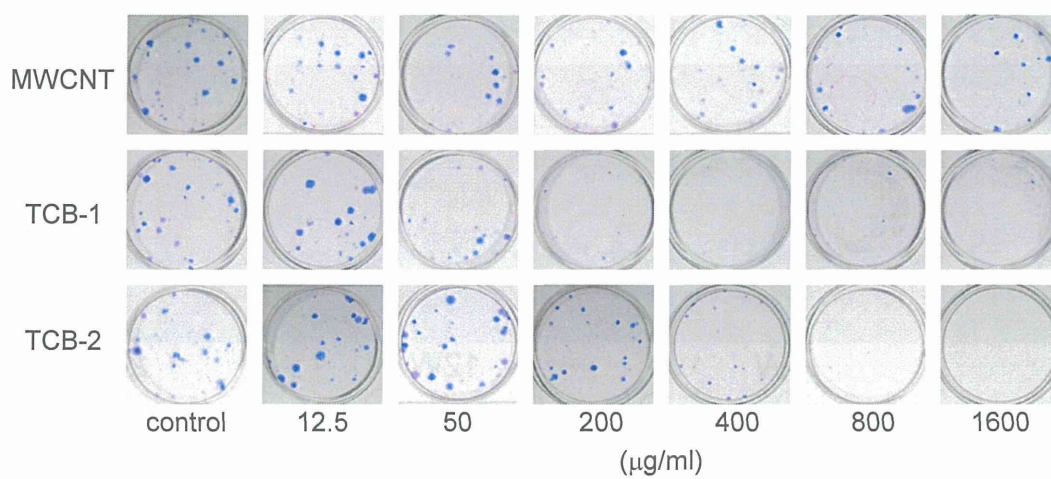
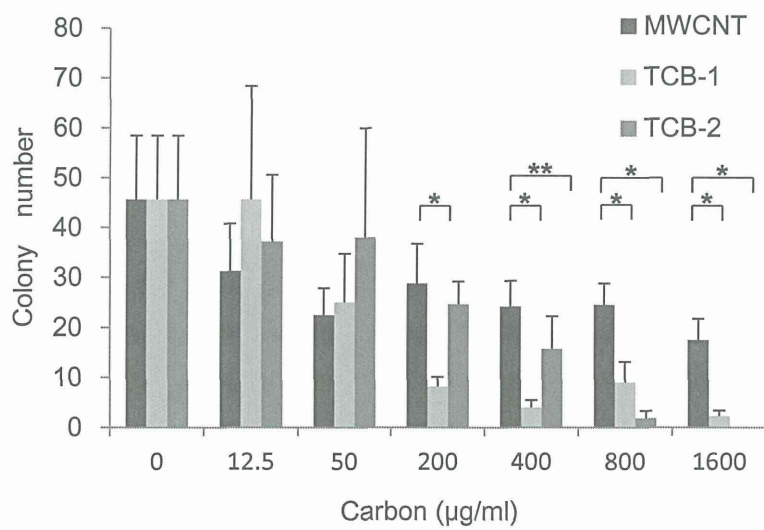
**d** TCB-2



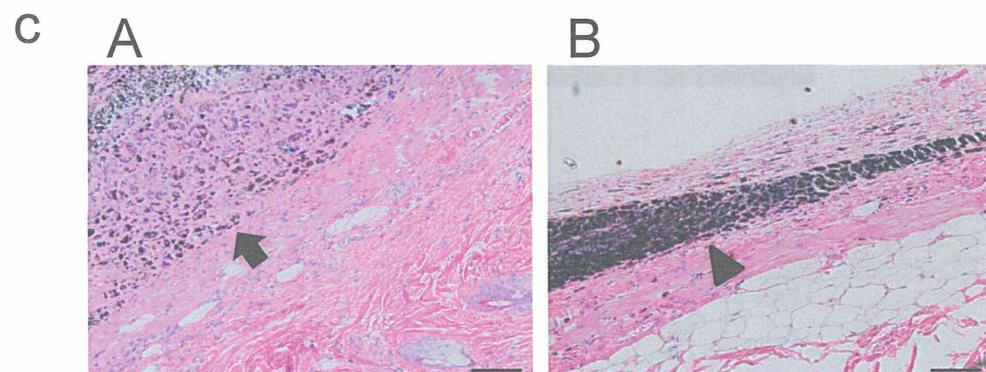
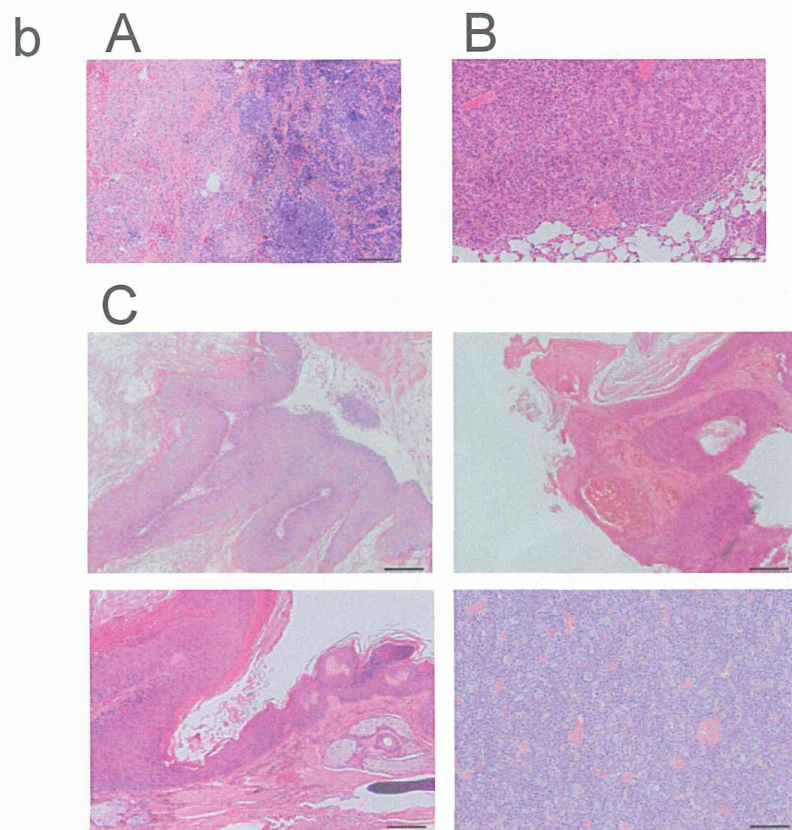
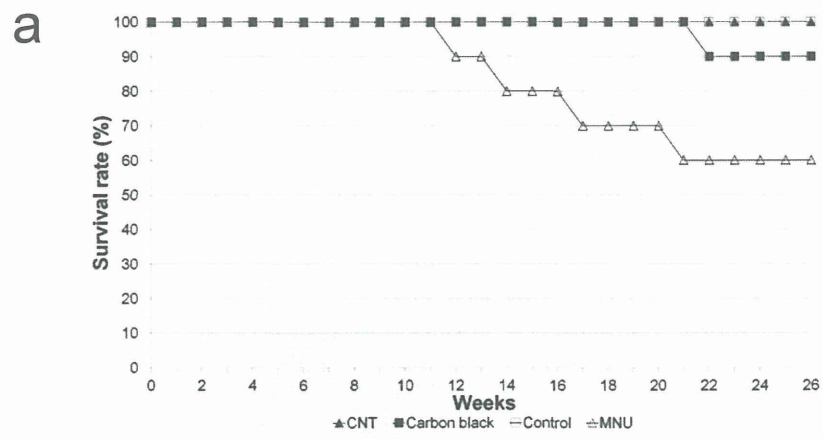
**e** ZDBC



**Figure 9**

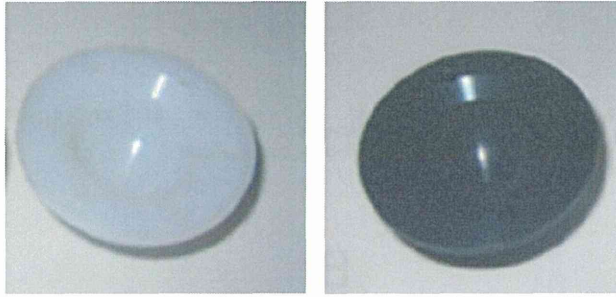
**a****b****c****Figure 10**





**Figure 11**

a



b



Figure 12

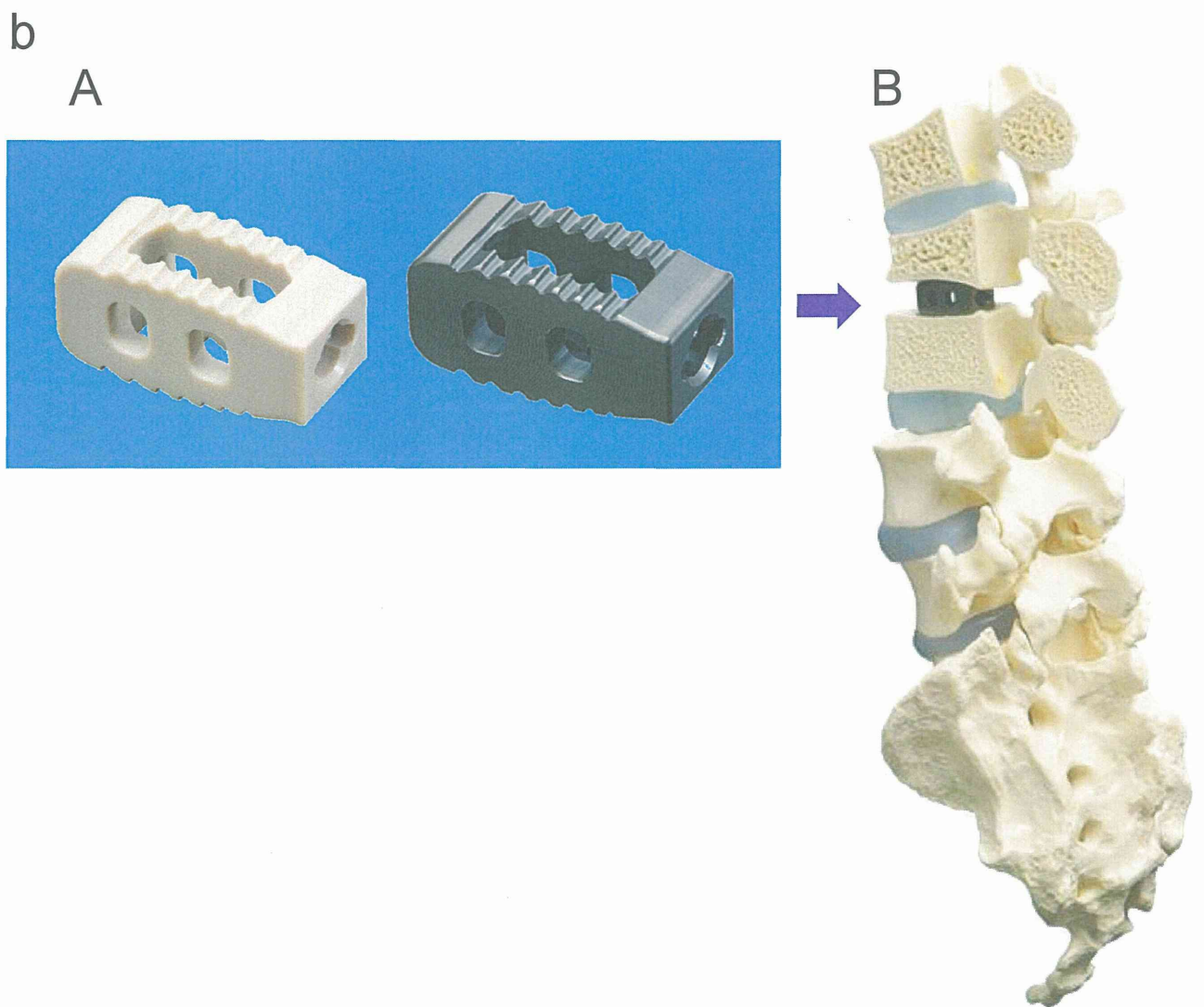
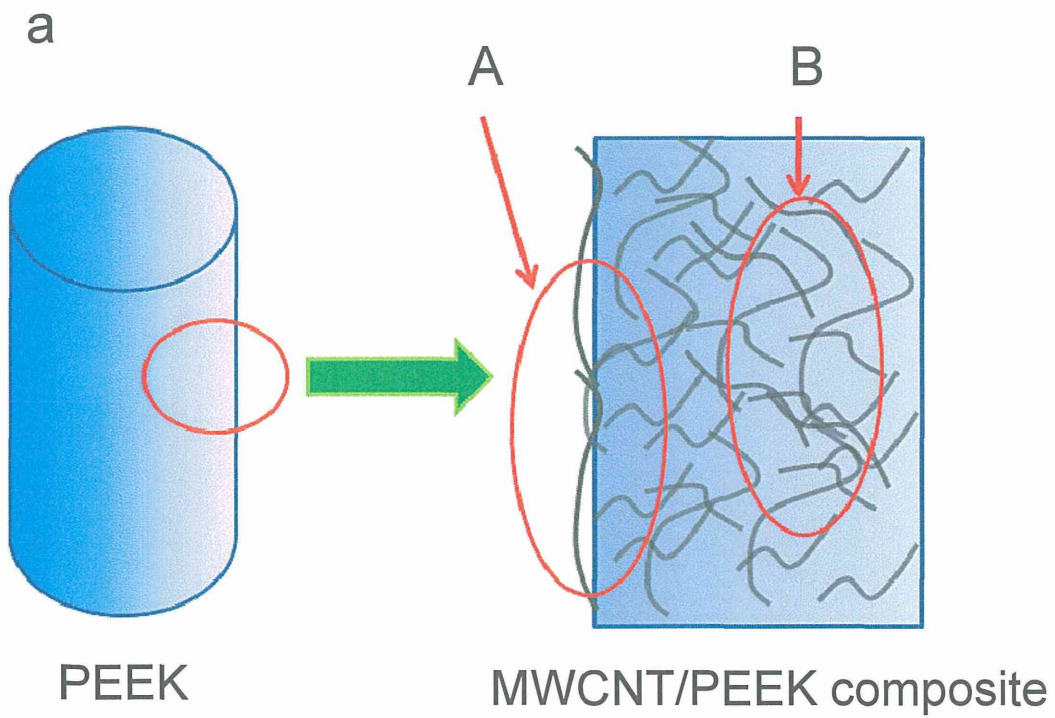


Figure 13

