

目次

1. イントロダクション
2. CNTsの生体材料への応用研究の現状
 - 2-1. CNTsを生体材料に応用するメリット
 - 2-2. 癌治療への応用
 - 2-2-1 バイオマーカーとイメージング
 - 2-2-2 癌治療のDrug delivery systems
 - 2-2-3 外部エネルギーを利用した癌治療
 - 2-3. 再生医療への応用
 - 2-3-1. CNT複合体による再生医療研究
 - 2-3-2. 骨組織再生
 - 2-3-3. 神経組織再生
 - 2-3-4. その他の組織再生
 - 2-4. インプラントへの応用
 - 2-5. 癌以外の疾患治療のためのDDSへの応用
 - 2-6. その他の生体応用
3. CNTsを生体材料に使用するためのin vivo 毒性研究の現状
 - 3-1. 生体内埋め込み試験
 - 3-2. 生体内動態
 - 3-3 化学的修飾の影響
 - 3-4 発癌性試験
 - 3-5 酸化ストレス
 - 3-6 生体分解性
 - 3-7 その他のin vivo試験
 - 3-8 小動物とヒトの体の大きさの違い
4. CNTsを生体材料に使用するためのin vitro 毒性試験の現状
 - 4-1 CNTsの細胞内への取り込み
 - 4-2 細胞毒性のメカニズム
 - 4-2-1 酸化ストレス
 - 4-2-2 免疫への影響
 - 4-2-3 細胞毒性を軽減する試み
 - 4-3 CNTsとタンパクの相互作用
 - 4-4 CNTsの遺伝毒性、突然変異、アポトーシス
 - 4-5 細胞のシグナリング
 - 4-6 細胞の選択
5. CNTsを生体材料に使用するための安全性評価のreference materials

- 5-1 CNTsにreferenceとなる物質がない理由
- 5-2 ナノサイズの人工粒子物質からなる生体材料
- 5-3 ナノサイズのカーボンブラック粒子をreferenceに用いたCNTsの安全性評価
 - 5-3-1 刺青はナノサイズのカーボンブラック粒子である
 - 5-3-2 CNTsとカーボンブラックの特性の比較
 - 5-3-3 安全性試験
- 6. 考察と展望
 - 6-1 CNTsを生体材料に応用するためのこれまでの安全性評価研究
 - 6-1-1 in vivo研究
 - 6-1-2 in vitro研究
 - 6-1-3 in vivoとin vitroの相関性
 - 6-2 CNTsの安全性評価のための適切なreference
 - 6-2-1 Referenceの必要性
 - 6-2-2 カーボンブラック
 - 6-2-3 国際基準
 - 6-2-4 安全性評価の方法
 - 6-3 CNTsを用いた生体材料の臨床応用の決断
 - 6-4 CNTsを用いた生体材料の臨床応用の道筋
 - 6-5 生物学的安全性評価の国際基準の構築
- 7. 結論

1. イントロダクション

カーボンナノチューブ (carbon nanotubes: CNTs) は、炭素原子の六員環がシート状に結合したgraphenを筒状に巻いた構造をしており、一層のものをsingle-walled CNTs (SWCNTs)、二層以上のものをmulti-walled CNTs (MWCNTs)と呼ぶ。その他にもcup-stacked carbon nanotubesやcarbon nano hornsをCNTsの一種とみなすことがある[1-3]。現在、これらのCNTsは魅力的な炭素材料、ナノ材料として、様々な分野で製品開発が活発に行われている[4-11]。その理由は、CNTsそのものが独特の有用な電気特性、熱特性、機械特性などを有するためであり、またCNTsを他の材料と複合することにより、母材の性能が大きく向上するためである[12-23]。CNTsの工業的な応用例として近年利用価値が高くなっているのが、その優れた電気特性を利用したリチウムイオン電池の電極添加材である。CNTsを付加することにより電池の劣化を防ぎ、充電までの時間を大幅に延長させている。今後もパソコンや携帯電話の多機能化、新しい携帯端末の出現、電気自動車の普及などにより高機能電池の需要はますます高くなることが確実である[24-30]。また、CNTsの優れた機械特性を生かした複合材料が、ゴルフクラブ、テニスラケット、自転車などのスポーツ用品で製品化されている。今後、航空機や自動車の軽量化のにも、CNTsの応用が期待されている[10, 14, 31-35]。精密部品にも、CNTsのもつ独特な特性の様々なメリットが利用されている。トランジスターやメモリーに用いられ、例えば電源を入れてすぐに印刷が可能で、長期間使用しても故障しにくいプリンターがすでに製品化されている。ディスプレイやテレビ画面への使用も、今後拡大していくであろう。また、静電気防止、電磁波遮蔽、蓄電などを目的とした製品にも、幅広く使用されている[36-45]。さらに、日本の原子力発電所で災害が発生し、原子力エネルギーの問題が露呈した現在、太陽光発電や風力発電などの新しいエネルギーの開発に、CNTsが大きな役割を担うことが期待されている[46-52]。

一方、医療の分野でも、このCNTsを応用した新しい生体材料を開発し、治療や診断に利用する研究が広範囲に進められている。例えば、CNTsを抗癌剤のDrug Delivery Systems (DDS)、温熱治療、生体内イメージングなど、癌の治療や診断に応用する研究が活発になっている[53-57]。また、CNTsを再生医療に応用する研究では、骨組織再生や神経再生の足場材料scaffold materialsとして優れていることが報告されている[58-63]。さらに、CNTsを既存の生体材料と複合することにより、機械的強度や耐久性を高めたインプラントの開発研究が進んでいる[64-67]。その他にも様々な疾病に対して、CNTsを応用するアイデアが多数提唱されている。

図1に示すのは、PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) (accessed 10

May 2013)で、“carbon nanotubes”と“biomaterials”をキーワードとして検索した結果の、英文論文数の推移である。論文数は2005年から右肩上がりに増加し、ここ数年で世界的に激しい競争が行われる研究分野になってきたことが明らかである。もちろんこの2つの単純なキーワードでは捉えきれない、CNTsの生体応用に関する論文が他にも多数あり、このグラフは単にCNTsの生体材料への応用研究の増加を示す指標に過ぎない。

このようにCNTsの生体材料への応用研究が激しい競争分野になり、医療を発展させる大きな可能性を秘めている理由の一つは、直径がナノサイズで長さがマイクロサイズの大きさが、生体との反応に適しているためである[68-70]。すなわち、大きさが細胞小器官のレベルであるため、生きている細胞への作用をコントロールできる可能性がある。具体的には、CNTsの太さは、細胞骨格を形成し、モータータンパクなどの様々な細胞活動に関与する微小管に近似している[71]。この生体との反応をコントロールできる大きさのCNTsを生体材料に応用することにより、目的とする細胞に標的を絞った、精度がより高く、生体への侵襲がより少ない治療や診断を実現できる可能性がある。

CNTsを生体応用する利点の二つ目は、CNT表面の反応性が極めて高いため、様々な分子をCNTsに結合させることが容易な点である[72, 73]。CNTsは、治療のための薬物分子、マーカーとなる分子、細胞に結合させる分子、標的組織に到達しやすくする分子など複数の分子を結合させるプラットフォームとして働き、標的細胞と接着して薬物を作用させたり、マーキングしたりして、効率よく治療や診断をすることが可能になる。このため、癌治療や再生医療など現在医学で最も重要視されている分野に、画期的な新しい技術を導入することが期待できる。近い将来CNTsの最大の応用分野は、電池や航空機などの工業製品ではなく、様々な疾患の治療や診断に用いる生体材料になる可能性が十分にあり、今後の医療の発展の鍵を握る極めて重要な材料である。

しかし、これらのCNTsの生体材料としてのメリットである小さなサイズや表面反応性の高さは、一方では生体に悪い影響を与える可能性がある。世界中で生体材料への応用研究が激増しているにもかかわらず、未だに臨床応用が達成されていないのは、CNTsを生体内に埋め込んだ時の安全性に不安があるからである[74-77]。現在、CNTsの安全性は世界中で研究が進められているが、その多くがCNTsの吸入に関するものである[78-83]。その理由は、CNTsを工業製品に応用する際に、人体への外部からの暴露経路として肺への吸入の可能性が最も高く、その毒性を早急に確認しなければならないためである。しかし、CNTsを生体材料として用いる場合の安全性は、吸入に対する安全性とは全く異なることは、忘れてはならない重要なポイントである[68, 69, 84]。CNTsを生体材料に応用するための安全性評価は、吸入に対する安全性評価と異なり、生体内に埋め

込むための生物学的毒性試験を行わなければならない。もちろん、毒性試験の一部は、吸入のための試験と一致することがある。しかし多くの場合、生体材料に特化した埋植試験、細胞毒性試験、発癌性試験、遺伝毒性試験などを行う必要がある。これらの毒性試験で生体に安全なことが確認されて、初めてCNTsを生体材料に応用することが可能になる。このため、近年CNTsの生体材料としての安全性評価に関する報告も増加している[54, 68, 85-89]。これらの報告により、CNTsは生体材料として安全性が高いことが明らかになってきたが、確実な結論をくだすことができず、研究者たちは困惑しているのが現状である。その理由は、CNTsそのものが生体材料の概念にこれまでなかった、ナノサイズの粒子物質であるためである[68, 90]。CNTsはもちろん薬物などの化学物質ではない。また、生体材料として一般的なbulkな物質ではない（この総説でbulkな材料／生体材料という語は、particlesではない、体積の大きな材料／生体材料を意味する）。更に、現在多数用いられている高い生体分解性を有する材料でもない。CNTsのような高い生体分解性をもたないナノサイズの粒子物質は、これまでの医療分野で用いられたことがない、新規な生体材料である。

ナノサイズの粒子物質であるがゆえに、CNTsの毒性で検討しなければならない要素はきわめて多い。CNTsの毒性要素は、太さ、長さ、比表面積、表面化学、化学的修飾の種類、CNTsそのものの欠陥、製造過程により残留する触媒などであり、すべて生体に影響を与える可能性がある[72]。また、生体投与時の要素として、分散剤の種類、分散剤の濃度、生体暴露方法、生体暴露期間などがある。さらに、投与後の生体側の要素として、臓器の特異性、細胞の特異性、生体有害事象の種類と頻度、生体内分布などを検討しなければならない[91]

このように考えてくると、CNTsの生体材料への応用はきわめて厳しいいばらの道であるように感じられる。またそのために、CNT生体材料の研究論文数は急速に増加しているにも関わらず、未だに臨床応用が全く行われていないのである[10, 77]。しかし、CNTsを生体材料に応用する大きなメリットが明らかになった現在、我々は立ち止まってため息をついてはいけぬ。今こそ、これまでの安全性評価に関する研究をまとめて現状を把握し、その問題点を認識して解決し、臨床応用に立ち向かうべき時である。基本的に人体は大部分が有機分子からできており、生命は炭素を基盤として成り立っているといえる[92]。これまで、心臓の人工弁、アキレス腱縫合等に用いられた炭素繊維、人工指関節等に使用されたpyrolytic carbonなど、純度の高い炭素からなる物質を生体材料に用いて問題を生じた例は一つもない[93-96]。

これまでの多くの研究者たちが積み重ねてきた研究論文を詳細に検討すると、CNTsを生体材料に応用するための最大の問題点は、生物学的安全性が確認されている最適なreferenceとなる粒子物質がなく、生物学的安全性を評価する基準を

決められなかったことが明らかになる。この重要な問題点は、すでに2009年に KostarelosらがNature Nanotechnologyでも明言している[68]。しかし、その後も最適なreferenceは見いだせないままであった。我々は、CNTsの安全性評価のためのreferenceとして、ナノサイズの純度の高いカーボンブラックが適切であると考えている[97, 98]。その理由は、黒色の刺青の主成分がナノサイズの純度の高いカーボンブラックであり、これまでに莫大な数の人が自分の体に埋め込み、その安全性が実証されているからである。このreferenceについては、5章で検討する。世界中の研究者が同じreferenceを使用して多方面から詳細なCNTsの毒性試験を行い、安全性評価の国際規格を構築すれば、早期にCNTsを生体材料として様々な臨床に応用することが可能になる。

本総説は、これまでのCNTsの生体材料応用研究とその安全性評価研究に関する重要な論文を可能な限り網羅し、これまでに発表した新しいreferenceを用いた我々の研究の概略を示し、これらを総合してCNTsの生体材料としての安全性について考察する。その後、本総説の目的であるCNTsを用いた生体材料を安全に臨床応用するための今後の進むべき道を、明確に提示する。忘れてはならないことは、この大きな挑戦を世界中の研究者の知性を結集して行えば、医療分野に大きな改革をもたらし、患者に大きな利益を与えることが可能になるということである。この総説は、この重要な目標を達成するための鍵を握る緊急の提案である。

2. CNTsの生体材料への応用研究の現状

CNTsの生体材料への応用研究は、その論文数の増加からわかるように、現在急速に進展している（図1）。CNTsの生体応用は多岐にわたり、しかも現在の臨床医学において最重要課題となっている分野が多い（図2）[84, 99-101]。この章では、これらを癌治療、再生医療、インプラント、癌以外のDDS、その他の応用に分けて述べる。しかし、それぞれの分野におけるCNTsの生体応用技術は、複数の分野で共通のものが多くある。例えば、癌治療で重要な抗癌剤のデリバリーシステムにCNTsを応用する技術は、癌以外を標的とした薬物のデリバリーシステムとしても有用な技術である。また、新しい高機能インプラントへの応用で鍵となるCNTsを他の生体材料と複合する技術は、再生医療における足場材へも応用される研究テーマである。よって、この分類方法は、これまでの雑多な研究報告を整理しやすいという理由で用いただけである。将来的には生体に応用するための重要な技術を中心にして、CNTsの生体材料研究を総合的に分類することができればより有用であり、進歩の速度がさらに早まると考えられる。

最初に、CNTsを生体材料に応用するメリットをまとめておく。なぜならこれから述べる生体応用研究は、全てこれらのメリットのいずれかを生かすために行われているからである。CNTsにメリットがなければ研究そのものが行われなかったであろうし、これらのメリットが極めて大きいために、多くの研究が短期間で進展してきたのである[69]。

2-1. CNTsを生体材料に応用するメリット

メリットの第1は、CNTsが小さいことである。これは、安全性の点でデメリットにもなる可能性があるが、そのリスクを大きく上回るベネフィットをもたらす。CNTsが小さいことのメリットを以下の6点に要約することができる。

1. 細胞内に入る、または細胞表面に接着することにより、細胞と反応させることができる。
2. 巨大分子や細胞小器官のサイズであるため、これらの生体内分子に作用させることができる。
3. 生体内の微細な構造をもつ部位に、作用させることができる。
4. 静脈内注射などにより血流に乗せることができ、標的部位へ薬物を運搬するDDSや生体イメージングなどに使用できる可能性がある。
5. 体内からすぐに排出される可能性がある。
6. 他の生体材料と複合させる際に、微細構造に影響を及ぼし、強度を上げるなどの特異的な効果を発揮することができる。

この中で4と5は、CNTsを血流に乗せて全身を循環させることを想定しており、リスクがベネフィットを上回る可能性があることを考慮しなければならない。

以上の様な、CNTsが小さいことにより生じる様々な生体への作用をコントロールし、そのメリットを最大限に活用し、デメリットを最小限にする努力が必要である。これは、現在研究が活発になっている他のナノ生体材料についても共通して言えることである。今後は、さらにナノサイズの物質と生体の相互作用が明らかになっていくであろう。近年構築されたばかりの新しい研究領域であるnanomedicineの一部として、ナノ生体材料は重要な位置を確立しつつある[102-105]。

メリットの第2は、CNTsは化学的な反応性が高い炭素の巨大分子であるため、化学的修飾を行いやすいことである[106]。生体応用で使用されるCNTsは、多くの場合、このfunctionalized-CNTs (f-CNTs)であることが予想される。特に、複合材ではなく、CNTsを粒子として使用する場合は、ほとんどがf-CNTsであろう[73]。なぜならCNTsは、本来相互に結合させることができない薬物、ペプチド、高分子ポリマーなどの分子を同時に結合させるための、プラットフォームとして働くことができるからである(図3)[107-112]。この特徴を生かせば、薬物運搬、細胞接着、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。例えば、CNTsに抗癌剤とモノクローナル抗体を付けて、癌のミサイル療法に応用することができる[113, 114]。

CNTsの表面の化学的修飾は、共有結合によるものと非共有結合によるものがある。当然共有結合はCNTsから離れにくく、非共有結合は離れやすいため、部位や用途に分けて結合方法を選択する必要がある。化学的気相 (Chemical Vapor Deposition: CVD) 法で作られたCNTsは、両末端が開いており、この部位に特異的に結合させることもできる[24]。さらに面白いことに、CNTs独特の形態である筒状の中空構造を生かして、中空部分に他の分子や原子などを入れて運ぶことができる。このような筒の内部に化学的修飾を行ったCNTsは、その形態からピーポッド (peapods) と呼ばれる[115, 116]。この内部空洞をカプセルとして使用したCNTピーポッドは、表面に出ると有害な薬物やCNTsから容易に離脱してしまう分子を運ぶことができるため、今後DDSや生体イメージングなどに応用する研究が発展することが期待されている[117-119]。

メリットの第3は、CNTsが純度の高いカーボンからなることである。カーボンはすでに人工弁など多くの生体材料に使用されており、これまでに純度の高いカーボンからできている生体材料が生体に悪い影響を与えた例はない[96]。CNTsがカーボンであることのメリットは、以下の8点である。

1. カーボンは人体を構成する主要な元素であり、カーボンのみからなる分子

は基本的に生体親和性が高い。

2. 質量に対する強度 (strength-to-wight) が高い。
3. 耐久性 (tensile strength) が高い。
4. ナノカーボン繊維は柔軟性があり、生体組織の特性の一つである柔軟性と一致している。
5. 反応性が高く、化学的修飾が容易である。
6. カーボンを複合することにより、強度が高くなるなど、他の物質に有利な特性を付加することができる。
7. 緩徐ではあるが、生体分解性を有する可能性がある。
8. 黒くて判別しやすく、光学顕微鏡でも検出できる。

第4のメリットは、CNTsの持つ優れた電気特性、磁気特性、熱特性を生体材料に生かせることである。実際に、CNTsの電気的特性を神経の再生[112, 120-122]や筋肉のアクチュエータに利用する等の研究が進められている[123, 124]。また、CNTsの磁気特性は、近年癌治療やDDSに応用する研究が盛んに行われているされている[55, 125]。さらに、CNTsの持つ高い光エネルギー吸収性や熱伝導性は、CNTsを癌の温熱療法に応用する研究で、その有効性が発揮されている[56, 107, 126-128]。

以上に列挙したように、CNTsは生体の組織や細胞と接触した際に、これまでの材料では考えられなかった様々な機能を発揮する可能性があるために、生体材料へ応用研究が多くの分野で急速に発展した。これらの生体応用のメリットと応用技術を概観すると、CNTsは医学を大きく進歩させる革新的なツールであり、CNTsの最大の応用分野は生体材料であるという時代が到来することを予感させる。

2-2. 癌治療への応用

CNTsの生体材料への応用研究で、最も活発に行われているのが癌治療への応用である。様々な方法で、様々な癌へのアプローチが行われている[55, 129-133]。癌の治療で最も重要なことは、早期に病巣を発見し、有効な治療方法を適用することである。世界的にますます癌治療の重要性が高まる中、CNTsは全く新しい治療方法および診断方法を生み出すことが期待されている。以下に現在注目されているCNTsの癌治療への応用を概観するが、その他にも記載しきれない研究が多数進められており、CNTsの臨床応用が最も期待されている分野であることがわかる。

2-2-1 バイオマーカーとイメージング

癌を発見するための腫瘍マーカー検査や画像検査の発達により、癌の早期診

断の技術は飛躍的に向上している。しかし、現在でも無症状の早期癌を発見することは未だに困難であり、末期癌になってようやく発見されるケースは多い。そこでCNTsをバイオマーカー検出技術に応用し、癌の初期で示される生体分子の発現を検出する研究が進んでいる。現在、前立腺癌マーカー（PSA）、大腸癌マーカー（CEA、CA19-9）、肝細胞癌マーカー（AFP）などの検出にCNTsを応用する効果が報告されている[134-137]。この技術は、CNTsのサイズが小さいために生体内に持ち込むことが可能で、生体内で直接バイオマーカーを検出するアイデアが報告されている[138-141]。

また、CNTsを非侵襲的なイメージングに応用する試みも活発に行われている。CTやMRIで造影される造影剤や重金属（ガドリニウムなど）と、癌細胞に親和性の高い抗体などを一つのCNTsに結合させて、微小な癌組織を鋭敏に検出することが試みられている[142-145]。特殊な例として、前述のCNTsの中空内部に重金属を格納したピーポッドCNTsを、癌のイメージングに応用する研究も進められている[146]。イメージングで最も研究が進んでいるのは、MR molecular imagingであり、癌の早期検出のために有効である。さらに、CNTsを生体内で高いコントラストと高い解像度で表示できる、photoacoustic molecular imagingに使用する研究も報告されている。De la Zerda らは、SWCNTsを蛍光ペプチドと混合してphotoacoustic imagingの造影剤に使用し、高い解像度が得られた[147]。また、血管新生は癌の発生および転移に重要な役割を担っている。このため、血管新生活性の非侵襲的検出は、癌の診断および癌治療への反応の評価において非常に重要である。腫瘍の血管新生に関連した様々な分子標的が同定され、腫瘍血管構造のターゲティングおよびイメージングに利用できる。CNTsの持つ光学的性質を利用して、血管新生イベントを画像化する新規の光プローブとして用いた光学的イメージングが開発されている[148, 149]。

2-2-2 癌治療のDrug delivery systems

CNTsの生体応用研究において、癌治療のDDSに応用する研究は、最も活発な分野である。多くの癌治療において極めて重要な役割を担う化学療法では、副作用が問題となり、十分量の薬物を標的臓器にデリバリーさせることが困難な場合がある。CNTsは比表面積が非常に大きく、癌の治療に有益な多くの分子をその壁や先端に付着させることができるため、癌治療のDDSに適した生体材料になる[89, 129, 150, 151]。このシステムは、CNTsをプラットフォームとして、薬物、抗体などのタンパクやペプチド、脂質、多糖類などの複合体で構成される（図3）。例えば、親水基、癌細胞と結合させるためのモノクローナル抗体、抗癌剤などを同時に結合させた、効率の高いミサイル療法が報告されている[117]。これまでのマイクロスケールのシステムでは生物学的障壁のために到達

できなかった癌細胞に、CNTsを用いたナノスケールのシステムによって薬物をデリバリーすることができる[152]。なぜなら、functionalizeされたCNTsは、その小さなサイズを生かして、endocytosisなどの細胞内へ物質を取り込む機序によって、細胞膜を通過することができるからである。細胞表面上の癌細胞特有の受容体が、CNTsに付着させたペプチドや選択的に受容体に結合するligandが認識して結合することで、薬物が付着したCNTsはより安全かつ効率よく細胞内に入り込み、癌細胞に作用することが可能となる。理想的なDDSとは、必要な時に必要な量を必要な部位にだけ作用させることであるが、CNTsを使用したDDSはそれを実現できる可能性がある。[132, 153, 154]。

McDevittらは、骨髄内にhuman B-cell lymphomaを移植したマウスに、腫瘍特異的なmonoclonal anti-CD20 antibody (Rituximab)をつけたSWCNTsを静脈注射すると、lymphomaにSWCNTsが集積することを示した[110, 155]。またChenらは、親水性のf-SWCNTsをプラットホームとし、腫瘍認識モジュール（ビオチンとスパーサー）を表面に付けて癌細胞に特異的に接着させ、さらに抗癌剤（切断可能なリンカーをもつタキソイド）のプロドラッグモジュールを結合させた。この腫瘍標的DDSを癌細胞に作用させ、細胞内移行、薬物放出、細胞内活性化により高い効率で癌細胞の障害を導くことを立証した[153]。一方、CNTsに遺伝子を結合させて、標的となる癌細胞内へ運び込む、新しい遺伝子治療への応用も検討されている[156-160]。このようなCNTsをプラットホームとしたDDSは、無限のバリエーションがあり、自由に設計することができるため、画期的な癌治療システムを誕生させることが期待されている。

このようにCNTsをDDSとして応用する場合には、その薬物動態を明確にしなければならない。CNTsを局所に注入する方法と、静脈内注射などで血液に乗せる方法が考えられ、特に後者の場合にはCNTsと薬物の複合体の体内動態を十分に検討しなければならない[105, 161-165]。この際、薬物を結合させるCNTsの性質、特に太さや長さ、柔軟性などと、薬物を結合させたことによる変化が、血流に乗せた場合に大きく影響してくる要素である。当然CNTsをDDSとして腫瘍部位に直接注入する方が、安全性が高い。さらに、癌組織に効率よく取り込まれるように、磁石で操作するシステムの検討も行われている[166, 167]。例えば、磁性官能化CNTsは、磁場下でリンパ節に移動しやすい性質を利用して、リンパ節に転移した癌を攻撃する研究が行われている。magnetic functionalized CNTsを付加したゲムシタビン（GEM）は、in vitroおよびin vivoで、磁場下においてリンパ節転移癌が良好に退縮し転移が抑制された[55]。その他、様々なアイデアのもとにCNTsを応用した抗癌剤のナノスケールDDSが開発され、多数報告されている[101, 128, 168-170]。

2-2-3 外部エネルギーを利用した癌治療

CNTsの電磁波のエネルギーを吸収する性質を利用して、癌の温熱治療に応用する様々な研究が行われている[53, 171-174]。例えばKamらは、腫瘍特異抗原決定基をつけたCNTsを癌細胞にだけ取り込ませ、局所に赤外線を照射し、発熱によって癌組織が特異的に破壊されることを示した[107]。また、Levi-Polyachenkoらは、結腸直腸癌の腹膜播種の治療において、オキサリプラチンまたはマイトマイシンCの存在下で、熱源としてCNTsの赤外線吸収を利用し、結腸直腸癌を10秒以内に42℃に急速加熱する方法を開発した[175]。最近の報告では、CNTsに赤外線を当てると熱とともに癌細胞に有害な活性酸素が発生することに着目し、*in vitro*でヒトの肺がん細胞を用いた試験が行われた。赤外線を10分間当てて熱と活性酸素を発生させると、24時間後には癌細胞の45%が死滅した[56]。また、CNTsのマイクロ波吸収特性から、理論的には正確な加温が可能で、癌治療のマイクロ波温熱療法も有望である[173]。

一方暴露方法にも、工夫がなされている。Chakravartyらは、Anti-CD22 antibodyをSWCNTsにつけてB-cell lymphomaに取り込ませた後にlaser radiationを行い、腫瘍組織の縮小に成功した[176]。また、CNTsとエタノールを投与し、レーザーを照射して発生する気泡により癌細胞を破壊するというユニークなアイデアもある[177]。近年、ナノ秒パルス電界を用いた方法も報告され、膵癌細胞株PANC1をMWCNTs存在下でナノ秒パルス電界に曝露すると、対照細胞に比べ、細胞の生存率が2.3倍低下した[178]。

また、CNT/DNA/Ig G antibody複合体を、標的とする癌細胞に結合させて、効率よく温熱療法を行う研究や[179]、CNT/spolyethylenimine/siRNA複合体がRNA干渉とphotothermal therapyの2つの作用を同時に発揮して癌を治療する報告もある[128]。さらに、量子ドットとCNTsの結合が、癌のイメージングと温熱療法を同時に達成するという報告もあり[180]、そのバリエーションはますます広がっている。

一方、CNTsに金属鉄のナノ粒子を結合させて、癌の温熱療法に応用する研究もある。鉄のナノ粒子をCNTs内部に封入するピーポッドと、CNTs表面に癌細胞と結合させる化学的修飾を併用することが可能である。CNTs内部の鉄はその周辺環境との反応から保護されるため、生体適合性が良好である。CNTs内部に格納された鉄のナノ粒子は、電磁波照射により安全で有効な温熱療法を実現する[118]。このように、CNTsに付加した別の材料により温熱療法を行う、新しい研究開発も進められている。

これらのCNTsの外部エネルギーを吸収する能力を用いた癌治療を臨床応用するためには、電磁波の照射方法を検討しなければならない。これはエネルギーが体内で急速に吸収されてしまうためである。単純な照射では、体表面または体

腔表面に近い癌に使用が限られてしまう。しかし、線源を体内に刺入するシステムと併用すれば、深部の癌にも用いることができる可能性がある[171, 181, 182]。この癌の温熱療法というCNTsの特性を生かした応用分野は、現在急速に研究が発展している。

2-3. 再生医療への応用

再生医療とは、疾病や外傷などによって失われた人体の組織や臓器を、人工的に修復・再生する医療である。Embryonic stem cells (ES cells) の研究の後、2007年の山中らによるinduced Pluripotent Stem Cells (iPS cells)の開発により、再生医療の研究はさらに活発になった[183, 184]。再生医療では、細胞、成長因子、遺伝子などを用いて組織の再生を誘導するが、いずれの方法においても足場材がなくては組織を構築することができない。再生医療において最適な足場材の開発はきわめて重要であり、この足場材にCNTsを応用する研究が増加している[185-191]。

2-3-1. CNT複合体による再生医療研究

CNTsを使用した再生医療の研究は、これまでその複合体を用いたin vitroの研究が活発に行われてきた。CNT/コラーゲン複合体は筋細胞培養の足場材に、CNT/polyurethane複合体は、線維芽細胞の増殖および生合成の足場材に有効であった[192-194]。また、血管内皮細胞をCNT/polyurethane複合体上で培養すると、細胞増殖が促進されることに加えて血栓形成を抑制する効果が認められた[195]。CNT/poly L-lactic acid/hydroxyapatite複合体は、歯根膜細胞の接着および増殖を30%向上させた[196]。MWCNTsを組み込んだ再生絹フィブロイン膜は、ヒト骨髄幹細胞の接着と成長を支持することが示された[197]。SWCNTs不織フィルムが、様々な細胞の長期細胞増殖を強化した[198]。このように、CNT複合体を再生医療に応用するために新しい足場材を作成して細胞との反応を調べるin vitro研究は、他にも数えきれないほど報告されているが、一方でin vivo研究は少ないのが現状である[125, 174, 185-188, 190, 199, 200]。今後はこれらのin vitro研究の成果を基に、in vivoの動物実験で、目的とする組織や臓器の再生を実現する研究に移行していくことが期待される。その中で、現在最も進んでいるのが骨組織再生と神経組織再生にCNTsを応用する研究である。

2-3-2. 骨組織再生

骨組織再生に関しては、すでに2002年にin vitroでCNT/polylactic acid複合体が、骨芽細胞の増殖を促進することが示された[58, 201]。その後も、CNT/polycarbonate urethane複合体やCNT/ poly-lactic-co-glycolic acid複合体が、骨

芽細胞の接着を高めることが報告された[202-204]。2006年になると、SWCNTsやMWCNTsが単独で骨細胞や骨芽細胞の増殖を促進することが示され[205]、その後もいくつかのin vitro研究の報告があり、CNTsのもつ骨に関係する細胞への不思議な機能が注目されていた[66, 186, 206-212]。

我々は2008年に、in vivoにおいてもCNTsが骨組織形成を促進することを、初めて明らかにした[213]。これは、human recombinant bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) による、マウス背筋内での異所性骨形成の実験系[214]を用いた。rhBMP-2の足場材として用いるコラーゲンシートにMWCNTsを複合させると、複合させない場合と比較して早期に骨組織が形成されることを示した(図4)。その後、他の研究者によっても、in vivoでCNTsが骨形成を促進することが確認されている。例えば、Bhattacharyaらは、layer-by-layer assembled carbon nanotube compositeをラットの頭蓋骨の骨欠損に埋め込むと、骨形成と骨修復を促進することを示した[215]。また、Kasaiらは、CNTsの一種であるカーボンナノホーンを、多孔ポリテトラフルオロエチレン膜に真空濾過により固定し、ラット頭蓋骨欠損を被覆した。カーボンナノホーン含有膜下の骨形成は、非含有膜下での骨形成よりも進展しており、カーボンナノホーンは骨再生を加速することを明らかにした[216]。

その後我々は、CNTsが骨組織の再生を促進するメカニズムの解明を試みた。2009年に、CNTsが特異的に破骨細胞の分化を抑制すること、その際に破骨細胞内で転写因子であるNFATc1が抑制されていることを明らかにした[217]。2011年にはCNTsが骨の主成分であるハイドロキシアパタイトの結晶形成の核になること、さらにCNTsがCaイオンを引き寄せ骨芽細胞を活性化させることを示した。この際に骨芽細胞から放出されたアルカリホスファターゼがハイドロキシアパタイトをCNTs周囲に析出させることを見出した[218]。以上から、CNTsは骨組織再生の際に、生体と相互に反応して骨形成を促進する機能的足場材として働くことが明らかになった。これまでにこのように生体と相互作用をすることにより機能する足場材はなく、CNTsは再生医療研究においてもブレイクスルーとなる材料になることが期待される。

2-3-3. 神経組織再生

現在、脳損傷、脊髄損傷、間隙の大きな末梢神経の欠損は治療が困難で、再生医療の重要なテーマの一つである。これらの神経組織の再生を増強および刺激する方法として、さまざまな神経導管や人工誘導装置の応用が試みられているが、十分な成果は得られていない[219]。CNTsを応用することにより、神経の再生医療に新しい手法が開発され、患者のQOL向上に貢献することが期待されている[122, 220-224]。

神経細胞成長のための足場材にCNTsを使用する研究は、10年以上前から活発に行われ、神経細胞の接着と軸索の成長に有用であることが示されてきた[117, 225-227]。CNTsは、培養液中で様々なニューロンの神経突起の伸長を促進した[228-230]。また、シュワン細胞の再生においても、CNTsが有効に働くことが報告された[231]。さらに、CNTsがembryonic stem cellsの神経細胞への分化に有用であるという報告もある[220]。これらの研究においては、CNTsの優れた導電性を生かして、電気刺激で神経細胞の成長を促進するアプローチが多い[120]。神経組織の再生医療は、CNTsのもつ電氣的性質と機械的性質を組み合わせることで生体材料に応用する、興味深い研究分野である。

2-3-4. その他の組織再生

骨や神経以外の組織でも、再生医療にCNTsを応用する研究が進められている。Khangらは、CNTsとpolycarbonate urethaneの複合体上で、軟骨再生が促進されることを見出した[232]。また、CNTsを骨格筋再生に応用する研究もある[233, 234]。さらに近年、CNTsを心筋再生に応用する研究が増加している。Mooneyらは、in vitroでmesenchymal stem cellsをCNTsで電気刺激することにより、cardiomyocyte lineageに分化させることに成功した。しかも、これらの細胞間では電気刺激によるcross talkが認められた[235]。Martinelliらも、CNTsが心筋の成熟を促進すること、心筋の電氣的特性が変化することを述べている[236]。

今後は、さらに多くの組織、臓器の再生にCNTsを応用するアイデアが出てくるであろう。再生医療は、CNTsのもつナノサイズで比表面積が大きい、表面反応性が高いという特性に加えて、導電性のような独特の特性が十分に発揮される分野である。さらに、生体と相互作用することにより骨形成を促進することのような予想外の効果が、様々な組織で見出される可能性があり、きわめて興味深い応用分野である。

2-4. インプラントへの応用

臨床において、整形外科を中心に歯科口腔外科や頭蓋顔面外科などでインプラントが多数用いられている。心臓外科においても人工弁や人工血管が使用され、その他の分野でも様々なインプラントが使用されている。これらのインプラントは、強度や耐久性などの機械的な特性とともに、生体組織と直接接触する材料であることから、高い生体親和性が必要とされる[237, 238]。特に整形外科領域では多くのインプラントが開発され、古くから臨床に応用され、現在も多数の患者に使用されている。例えば、変形性関節症や関節リウマチの治療に用いられる人工関節、骨折の治療に使用するプレートやスクリュー、脊椎固定に使用されるケージやロッドなどである。このため、整形外科用インプラント

に使用される材料は多彩である[239-241]。金属は、骨折治療や人工関節にステンレス、チタン合金、コバルトクロム、タンタリウムなどが用いられる。セラミックスは、人工関節や人工歯髄に用いられ、アルミナとジルコニアが圧倒的に多い。高分子量ポリエチレン (UHMWPE) は、人工関節の摺動部に用いられている。ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) は、脊椎固定に用いられることが多い。

我々は2003年から、人工関節の摺動部に使用されるポリエチレンにCNTsを複合する研究を行っている[58, 69]。人工関節を長期間使用していると、摺動部のポリエチレンが磨耗する。このために人工関節が破綻して、再置換手術が必要になる[242-245]。そこで我々はポリエチレンにCNTsを複合することにより、磨耗量を減少させ、長期間使用できる人工関節の開発を行っている。また、人工関節の摺動部にはポリエチレンではなくセラミックスが使用されることもある。セラミックスは磨耗しにくい、アルミナセラミックスは破壊しやすく、ジルコニアセラミックスは生体内で相転移して変性しやすい[246, 247]。そこで、アルミナセラミックスにCNTsを複合して、破壊しにくくしかも変性しにくい新規セラミックスの開発を行っている[248, 249]。CNTsとセラミックスの均一混合など難しい点が多いが、すでに破壊靱性値の向上に成功している。現在全世界中で人工関節置換手術を受ける患者数は大きく増加しているが、それに伴い、再置換手術を受ける患者数も増加し続けている[250]。CNTsを応用した人工関節を臨床に応用することができれば、再置換手術を受ける患者数を大きく減らすことができ、若い患者にも人工関節を行うことが可能になる。

さらに我々は脊椎固定手術に用いる椎体固定用ケージspine interbody fusion cagesに使用する、CNTとPEEKの複合材料の開発を行っている。PEEK材の椎体固定用ケージは以前から臨床応用されているが、骨親和性が悪いため、周囲の骨とインプラントが結合しないという大きな問題がある[251, 252]。そこで、2-3-2章の骨組織再生で記載したCNTsが骨誘導能を有する特性を生かし、CNTsをPEEKに複合することにより、骨親和性の高いCNT/PEEK複合材料を用いた椎体固定用ケージを開発している。これらの人工関節や脊椎固定用ケージの開発については、6-4章で再度述べる。

これらの複合材料において、CNTsの複合率は10 wt%以下、多くの場合5 wt%程度であり、生体内に入るCNTsの量は少ない。さらにこれらは複合体であるため、CNTsが粒子として生体に接触する可能性は全くないか極めて低い。このためCNT複合材料は、CNT粒子と生体の反応が問題になることはほとんどなく、安全性がきわめて高いと考えられる。我々は、CNTsの生体材料への応用は、生物学的安全性の点から考えて、このような複合体であるインプラントの使用から開始するべきであると考えている[253-255]。

このようにCNTsの強化材としての有用性と、複合体であることの安全性を考えれば、今後様々なCNT複合インプラントの開発が行われることが予想される。金属やセラミックスへのCNTsの複合は技術的に難しいが、成功した時の利点は大きい。これまであまり注目されなかった分野であるが、CNTsの臨床応用に最も近いため、多くの研究開発が進められることを期待している。

2-5. 癌以外の疾患治療のためのDDSへの応用

2-2-2章の癌のDDSでも述べたように、CNTsは比表面積が大きく表面の反応性が高いため、低分子、遺伝子、タンパク、ワクチンなど様々な分子を何種類も大量に結合することができる。また生体の微細な構造にまでデリバリーできるため、理想的なDDSになることが期待されている[100, 117, 256-258]。そのバリエーションは多く、近年、より有用なCNTsのDDS構築へ向けて、研究は急速に進展している。特にDDSの場合、細胞膜との反応が重要であるため、この点について多くの工夫がなされている。例えば、細胞との接着性を高めるために、SWCNTsをインテグリンモノクローナル抗体と結合させる研究が報告されている[114]。また、細胞膜への影響を少なくするために、CNTs表面に二重層形成脂質を付着させることが検討されている[54, 259]。これらのDDS研究は、癌以外にも様々な疾患をターゲットにして多数行われており、その一端を紹介する。

CNTsとalginate microsphereの複合体は、alginate microsphere単独に比べて、薬物のカプセル化効率が向上し、薬物の漏出が減少した。このため、呼吸器系疾患の治療に用いられるtheophyllineを持続的に放出する特性が向上し、長期間治療効果が保たれる有用なDDSとして応用できる可能性が示された[260]。CNTsを感染症治療のDDSに応用する研究では、治療活性のある分子をCNTsに結合させて、病原菌の細胞内に運ぶことに成功した[261-263]。特に既存の抗生剤が無効な耐性菌株に対して、その作用機序が異なるため、革新的な治療法になる可能性がある[264]。さらに、CNTsそのものが細菌の増殖を抑制するという報告もある[265-268]。また、CNTsを修飾してimmune activationまたはvaccinationする治療が試みられている。例えば、CNTsにneutralizing B cell epitopeを結合させることにより、手足口病のvirusに強いanti-peptide antibody responseを誘導する免疫治療の可能性が示された[269]。

CNTsを遺伝子のデリバリーシステムに用いる研究も、注目されている。例えば、DNA被覆MWCNTsを超音波処理により得ることができた。この複合体はMWCNTsが十分に分散し、DNAによって安定に被覆されたため、遺伝子治療への応用が期待できた[256]。また、polyamidoamine dendrimersを、MWCNTsの表面に付加させると、生体分子を固定化しやすくなり、多くの遺伝子のDDSとして有望であった[270]。アンチセンス核酸は、分解が速い、細胞膜に拡散しにくい

という2つの問題のため、アンチセンス療法は臨床治療への応用が限られている。しかし、アンチセンスmyc (antisense-myc) をSWCNTsに結合させると、HL-60細胞に容易に取り込まれ、細胞内遺伝子の制御に有効であった[271]。さらに、CNTsをデリバリーシステムに用いてshort interference RNA (siRNA)を細胞内に導入した報告も複数ある[272-275]。2010年のLadeiraらの報告によると、導入効率は95%と高く、細胞毒性は認められなかった。このように、CNTsを遺伝子のDDSに応用する研究は近年急増しており、遺伝子治療への応用だけでなく、生物学研究の重要なツールになる可能性がある。

2-6. その他の生体応用

これまで見てきた、癌治療、再生医療、インプラント、DDS以外にも、CNTsは様々な治療現場で生体材料への応用が期待されている[276]。

CNTsは、センサーやアクチュエータとして、ナノ医療において大きな可能性を秘めている[89]。CNTsの電氣的性質は、神経組織におけるセンサーや刺激物質として応用が可能である。Liopoらは、神経芽細胞腫NG108およびラット一次末梢ニューロンを伝導性のSWCNTフィルムにより電氣的に刺激した場合、高い電圧活性化電流を示すことを明らかにし、SWCNTsとニューロンの電氣的カップリングを証明した。この結果から、SWCNTsは神経組織の刺激をコントロールできる有効な材料であることが示唆された[120]。また、CNTsの電氣的性質を利用して筋肉のアクチュエータに応用する研究や、artificial musclesそのものに応用する研究もある[124]。2012年にCNT複合材料を応用した人工筋肉の開発が、LimaらによってScience誌に掲載された。これはguest-filled, twist spun carbon nanotube yarnsが人工筋肉のアクチュエータとして適していることを示したもので、工学的に極めて優れた特性を有していた。この研究は生体外での使用を目的としたもので、現時点では生体内で筋肉の代用をすることは技術的に不可能であるが、今後生体材料への応用研究の発展を期待する[123, 277]。さらに、DNA封入MWCNTによる、DNAアクチュエータも、コンピュータを用いて設計されている[278]。

一方、糖尿病患者のグルコース濃度を計測する生体内センサーとして、CNTsを応用する研究がある。CNTsは近赤外線発光を調節できるため、生体内で近赤外線による分子同定によりグルコースを検知する試みである[279]。このように、CNTsを特異的な生体分子に吸着させてモニターリングする生体内センサーへの応用が、様々な疾患で可能である。その他にも、CNTsをナノサイズの体内注射に応用する研究や、CNTsを生体内に埋め込む医療用ナノロボットに応用する研究もあり[99, 280]、様々なアイデアが出されている。

以上の様に、CNTsのもつ独特な電氣的特性、熱特性、機械的特性は、既存の

概念にない新しい生体材料を生み出すことが期待できる。さらに、CNTsを様々な細胞や組織とコンタクトさせると、これまで知られていない生体内での特性が発見される可能性がある。CNTsを生体材料に応用する研究は、さらに大きく発展することが期待でき、全く新しい治療技術の誕生に大きな夢を抱かせる。

3. CNTsを生体材料に使用するためのin vivo 毒性研究の現状

これまで発表されたin vivoにおけるCNTsの毒性研究の多くは、吸入に関するものである。CNTsの吸入における毒性は、2008年のTakagiらの論文とPolandらの論文における腹腔内投与試験による炎症と発癌の研究が世界的に注目され、その後急速に進展した[281, 282]。この2つの論文は、中皮組織が胸腔と腹腔に存在するために、吸入による中皮組織の反応を腹腔内投与で代用した研究である。この際、常に問題にされたのは、CNTsがアスベストと同じサイズの繊維状粒子である点である[283-287]。しかし、根本的にCNTsとアスベストは毒性が異なる物質である。前者は純度のきわめて高い炭素であり、後者は不純物が多量に含まれる鉱物である。CNTsは柔軟性に富み、アスベストは固い。現在、腹腔内投与での評価は、中皮腫が発生するメカニズムの探求など特定の目的に用いられることが多く[80, 288, 289]、CNTsの吸入毒性は吸入暴露試験及びその代用である気管内投与試験がスタンダードになっている[79, 82, 290-296]。最近は、吸入暴露試験はより精度の高いものになっており、暴露後の体内組織や血液のgene expressionの精査まで行われている[297]。これらの多くの研究を受けて、The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)、European Community (EC)、米国のThe National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)、日本のThe National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)などによる、国際的な毒性評価の結果が発表され始めている[298-302]。それらによると、CNTsの吸入毒性はアスベストと比べると明らかに低い。現在の毒性評価の課題は、肺に炎症を生じる閾値を決定することである。近い将来、国際的な吸入におけるCNTs暴露の基準が制定されるであろう。世界的に見ても、吸入毒性についてこれほど研究が積み重ねられ、議論が行われてきた物質は少ない。工業製品の製造、使用、廃棄については、その時点での最新の研究結果により導かれた安全性対策を十分に行い、基準値が制定されればそれを確実に順守していけば、問題なく取り扱うことができると考えられる[303]。これは、CNTsを含む生体材料の研究者、製造業者においても、吸入暴露について守るべき事項である。

イントロダクションで述べたように、人体において、吸入による毒性と埋め込みによる毒性は全く異なる。吸入毒性に比べて、CNTsを生体材料に応用するためのin vivoの毒性評価の報告は少ないが、近年増加してきている[77, 91, 191, 304]。残念ながらこれまでのCNTsを生体材料に用いるためのin vivoの毒性評価は、いずれもreference materialが設定されていないという大きな問題があるが[68]、発表された論文の多くが、CNTsは生体材料として毒性がきわめて低いことを示唆していることは注目すべきである[91, 191, 305, 306]。