

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592508

研究課題名（和文）

ナノカーボン分子ヒーターによる組織再生促進モデルの構築

研究課題名（英文）

Tissue regeneration model construction by nano-carbon-based molecular heater

研究代表者

川口 稔 (KAWAGUCHI MINORU)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10122780

研究成果の概要（和文）：

カーボンナノチューブの光熱転換特性を利用して再生部位に直接貼付して温熱付加ができるゲルデバイスを創製した。アルギン酸ベースのこのゲルデバイスは近赤外線照射によって温熱を発現し、照射エネルギーによって温熱制御が可能であった。マウス皮下に埋入した場合も近赤外線の照射により局所で特異的な温熱発現が認められたことから、本ゲルデバイスは再生部位に直接あるいは間接的に応用できる温熱デバイスとして有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Alginate gel-based heating device containing carbon nanotube was prepared for applying the tissue regeneration. This device releases substantial vibrational energy after exposure to near-infrared (NIR) radiation. Their heat generation was dependent on the irradiated NIR energy. This gel device showed localized heating in subcutaneous tissue of mouse by NIR irradiation. The results of this study revealed that the carbon nanotube-containing gel would be a useful heating device which could be applied to portion to be regenerated directly or indirectly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：カーボンナノチューブ、温熱付加、アルギン酸ゲル

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ（CNT）のバイオ医学応用への展開は CNT を酸処理して水に可溶化することが可能になって以来、飛躍的な進展を見たが、その多くはキャリアーとしての研究であった。一方で CNT の持つ特異的な光熱転換作用は生体に温熱刺激を与える可能性が示唆されたが、ハイパーサーミア

に代表される腫瘍組織の変性・壊死を狙ったものだった。そのような状況の中で本研究では、その温熱を組織再生の促進因子としてとらえ、体内挿入もしくは外装式のデバイスを開発することをめざした。

2. 研究の目的

CNT の光熱転換を生かしたデバイスを創製するためには、①CNT を分散する適切なゲル

素材の選択②いかにして温熱を制御するかがポイントなる。そこで本研究では、CNTを分散するゲル素材として生体親和性に優れたアルギン酸を選択した。さらに光熱転換させる光源として近赤外線（NIR）を選択して照射エネルギーと温熱発現との関係を検討した。本研究の目的は加工性と成形性に優れたゲルシートを調製し、温熱発現の制御方法を確立することにより、再生部位に応じて適用可能な温熱デバイスを創製することにある。

3. 研究の方法

1) アルギン酸ゲルシートの調製

単層カーボンナノチューブ（SouthWest Nanotechnology 製）は内径 1 nm、長さ 800 nm で通法により酸処理して可溶性 CNT を作製した。アルギン酸ナトリウム(2%)に対して 0.5%重量比で可溶化した CNT を配合したものをカルシウム塩でゲル化させて CNT 配合アルギン酸ゲルを調製した。オートクレーブで滅菌後にディスクあるいはシート状に形成して実験に供した。

2) ゲルシートの温熱特性

調製したゲルディスク(15mm φ)に近赤外線を照射距離 2cm、強度 2.0~2.8W/cm²で照射し、接触型温度計で温熱発現を経時的に測定した。

3) 細胞培養用培地への間接的温熱付加とマウス骨芽細胞様細胞のヒートショックタンパク発現

調製した CNT 配合ゲルディスクを培養プレートの底面に貼付し下部から近赤外線を照射した場合の温熱発現を測定した。またマウス骨芽細胞様細胞(MT3T3-E1)を培養して温熱付加(42°C)を与えた場合のヒートショックタンパクの発現を検証した。

4) マウス皮下に埋入したゲルの温熱発現の測定

可溶化した CNT をマトリゲルに配合し(0.01~0.5mg/mL)、マウスの皮下に 500μL 注入して近赤外線を照射した際の温熱発現を挿入型熱電対温度計で計測した。また照射時のマウス表皮の温度を赤外線サーモグラフィで観察した。

5) ラット頭蓋骨欠損モデルへの温熱ゲル応用

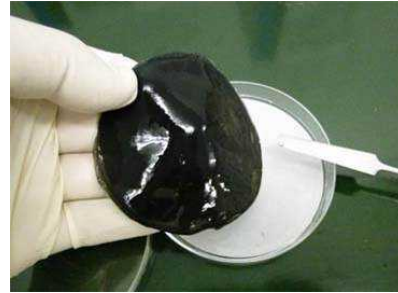
ラットの頭蓋骨に直径 8mm の欠損部を作製し、骨伝導性を有する DNA/プロタミン複合体を填入し、骨膜縫合を行った後に切開部を縫合した。この後に欠損部を被覆するように頭頂部にゲルを貼付して外装式の温熱デバイスの熱発現を測定した。

4. 研究成果

1) アルギン酸ゲルシートの調製

調製したゲルシートはキャストして成形

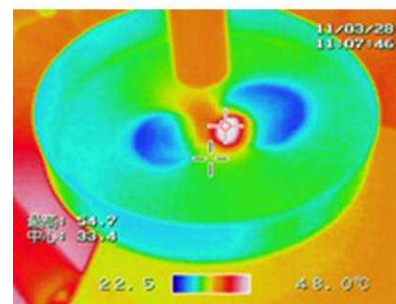
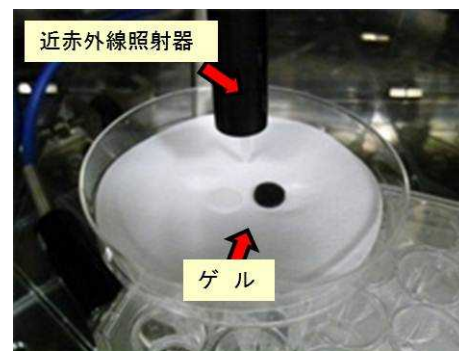
する際の条件によって任意の形態に加工することが可能であった。またゲルのサイズも最大で 10×10cm まで均一に成形でき、滅菌後も形状は完全に維持されていた。



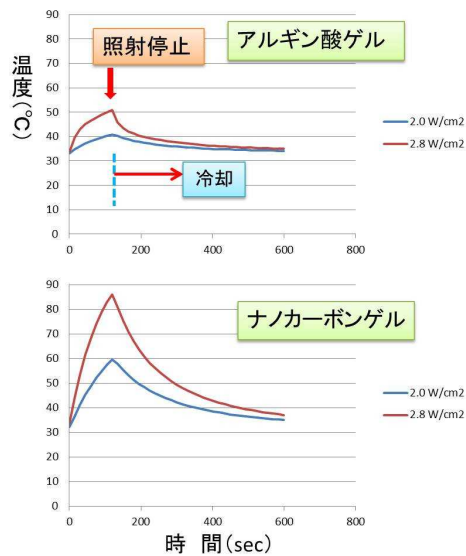
(図) 調製したアルギン酸温熱ゲル

2) ゲルシートの温熱特性

近赤外線照射によってゲルシートは迅速な温熱を発現し、最高温度や昇温速度は照射する近赤外線の強度に依存していた。また強度と照射時間を調整すると任意の温度で維持継続することができたことから、照射エネルギーによって温熱制御が可能なゲルデバイスを調製することができた。



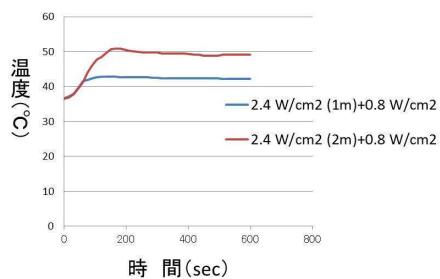
(図) ゲルシートとアルギン酸単体ゲルディスク(対照用)に近赤外線を照射した際の温熱発現を測定したサーモグラフィ。顕著な発現の差が確認できる。



(図) NIR 照射時の発熱動態. CNT 配合ゲルは速やかな発熱を示し、最高温度と速度は照射強度に依存していた.

3) 細胞培養用培地への間接的温熱付加とマウス骨芽細胞様細胞のヒートショックタンパク発現

培地への間接的温熱付加による培地温度の変化の一例を下図に示す.

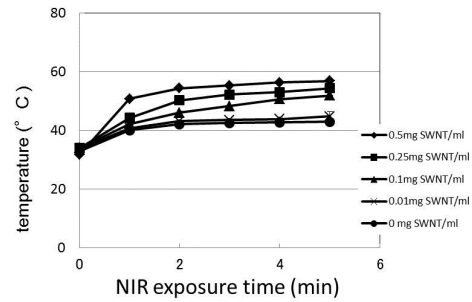


培地の温度は照射した NIR の強度と照射時間に依存しており、所定の温度を設定して維持継続させるプログラム温熱付加が可能であった. またマウス骨芽細胞様細胞に 42°C の温熱付加を行うと、ヒートショックタンパクである HSF2 の特異的な発現が観察された.

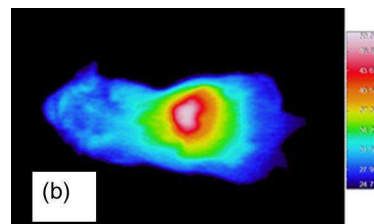
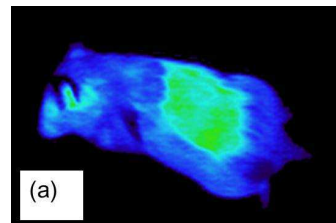
4) マウス皮下に埋入したゲルの温熱発現の測定

マウス皮下に埋入した CNT ゲルに NIR 照射を行うと、特異的な温熱発現が認められた. その発現パターンはゲル中の CNT 濃度に依存しており、前述の NIR 照射エネルギーによって発現の制御が可能であった.

またマウスの背部表皮のサーモグラフィーから、皮下での発熱が注入した局部でのみ発現していることが明瞭に観察された.



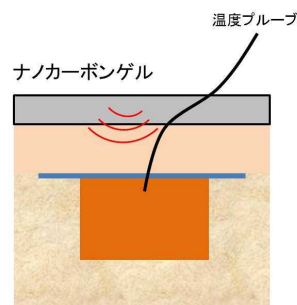
(図) マウス皮下に埋入したゲルの発熱を示す. ゲルの発熱はゲル中の CNT 濃度に依存していた.



(図) マウス皮下に埋入したゲルに NIR 照射した際のサーモグラフィーを示す. (a) はゲル単体で特異的な発熱はみられないが、(b) では配合された CNT により局所での特異的な発熱が観察された.

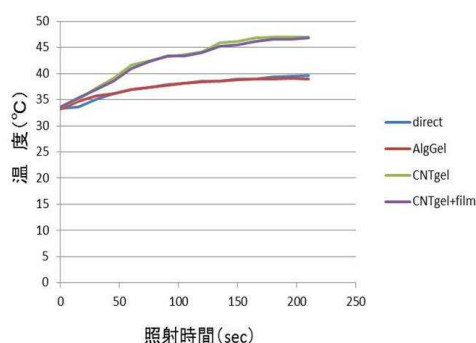
5) ラット頭蓋骨欠損モデルへの温熱ゲル応用

ラット頭蓋骨欠損部の直上に温度計をセットし、頭頂部表面に貼付したゲルの温熱測定の様式図を示した.

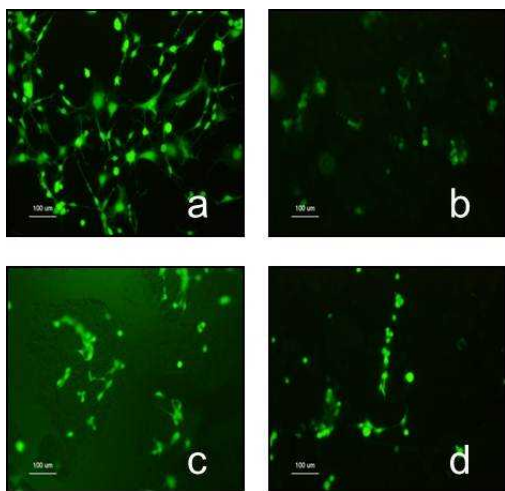


貼付したゲルからの温熱は頭頂部皮膚を通じて欠損部の補填材にロスなく伝達する

ことが明らかとなった．このことから CNT 配合ゲルを頭頂部に貼付する外装式のデバイスとして使用することが有効な手法であることが示唆された．



(図) 頭蓋骨骨欠損部の温度変化を示す．頭頂部に貼付したゲルからの温熱は皮膚を通じて十分に伝達することが示された．



(図) マウス骨芽細胞様細胞を CNT 配合アルギン酸ゲルディスク上で培養した顕微鏡像．ゲル周囲の細胞の培養五日後におけるカルセイン染色像 (a) に対して，ゲル表面においても接着した細胞の存在が認められた (b)．また接着促進のためにゲル表面に細胞外基質を塗布すると，フィブロネクチン (c) およびゼラチン (d) とともに顕著な差異はなかった．このことから，ゲルは生体表面に外装する場合に加えて，生体内に埋入した場合でも応用に支障はないものと考えられた．

(国内外におけるインパクト)

前述したように CNT の光熱転換作用は主として腫瘍細胞の熱変性・壊死といったアプローチが大半であり，温熱を組織再生の促進に応用する報告は見当たらない．CNT を温熱源とするメリットは局部にのみピンポイントで温熱付加を行えることである．また温熱付

加は NIR 照射による立ち上がりも速く，きわめて迅速な温熱付加ができる．このような利点と生体透過性に優れた NIR との組み合わせは，応用範囲の広い局所温熱デバイスとしてきわめて有用であると言える．本研究で試作したゲルデバイスは外装式，埋入式を問わず治療部位に限局した温熱付加を行い，組織再生を促進することができるものと期待される．

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kawaguchi M, Ohno J, Irie A, Fukushima T, Yamazaki J, Nakashima N, Dispersion stability and exothermic properties of DNA-functionalized single-walled carbon nanotubes, *Int J Nanomed*, 6, 2011., 729-736.

② Shinozaki Y, Mori N, Ohno J, Kawaguchi M, Kido H, Hayakawa T, Fukushima T, Rat calvarial tissues response to flowable DNA/protamine complex to be used as a protective membrane for guided bone regeneration, *J Oral Tissue Engin*, 9, 2012, 159-166.

[学会発表] (計 3 件)

① 入江昭仁, 川口 稔, 福島忠男, 大野 純, 松浦正朗, ナノカーボン分子ヒーターの創製 - 可溶性 CNT/アビジン複合体の調製 -, 第 54 回日本歯科理工学会学術講演会, 2009 年 10 月 1 日, 鹿児島市.

② 川口 稔, 入江昭仁, 福島忠男, 大野 純, 山崎 純, 松浦正朗, ナノカーボン分子ヒーターの創製 - CNT/抗体複合体の調製 - 第 55 回日本歯科理工学会学術講演会, 2010 年 4 月 18 日, 東京都.

③ 鍛冶屋 浩, 川口 稔, 堤 貴司, カーボンナノチューブによる骨再生への応用, 第 38 回福岡歯科大学学会総会, 2011 年 12 月 11 日, 福岡市.

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

なし
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 稔 (KAWAGUCHI MINORU)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10122780

(2) 研究分担者

福島忠男 (FUKUSHIMA TADAO)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80084250

大野 純 (OHNO JUN)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10152208

鍛冶屋 浩 (KAJIYA HIROSHI)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：80177378

(3) 連携研究者

中嶋直敏 (NAKASHIMA NAOTOSHI)
九州大学・工学研究院・教授
研究者番号：80136530