

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03839

研究課題名(和文)革新的口腔領域用生体材料を目的としたインテリジェントカーボンナノマテリアルの創製

研究課題名(英文)Development of intelligent carbon nanomaterials for innovative biomaterials for oral region

研究代表者

横山 敦郎 (YOKOYAMA, ATSURO)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20210627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：高機能かつ機能発現を制御できるインテリジェントカーボンナノマテリアル(i-CNMs)を創製し、口腔領域を対象とする革新的な生体材料を開発することを目的に、CNMsへの薬剤の担持と制御、CNMsによるチタンの表面処理、ならびにCNMs自立膜の製作を行った。CNMsへの薬剤の担持と抗菌性の付与、また光照射による効果発現の制御が可能であった。チタン表面にCNMsを均質に修飾することによりチタン表面の骨形成は促進された。CNMs自立膜は、GBR膜としての遮蔽効果とスペース確保に優れていた。以上の結果から、i-CNMsの創製と新たな生体材料への応用の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、カーボンナノマテリアル(CNMs)の物理・化学的性質に加えて生物学的特性を利用し、薬剤や成長因子をCNMsに担持するとともに、その効果発現を制御する革新的なCNMsを利用した生体材料(コンプレッションプロダクト)を創製したことである。社会的意義としては、喫緊の課題であるインプラント周囲炎に対する新たな治療法の可能性とともに、骨代謝活性が低下した有病者や高齢者に対する骨形成の新たなストラテジーを示し、咀嚼機能を含めた口腔機能回復の可能性を示したことである。

研究成果の概要(英文)：In this study, application of carbon nanomaterials (CNMs) for drug carrier and controlling release of drug, surface modification of Ti with CNMs, and production of CNMs based membrane were done to develop the intelligent carbon nanomaterials (i-CNMs) with high function capable of controlling its expression. Antibiotics was loaded to CNMs. It was able to control the expression of its function by photoirradiation. Also, acceleration of bone formation was observed around Ti by surface modification of Ti with CNMs. CNMs based membrane showed excellent shielding property and maintaining the space for GBR membrane. These results suggested the invention of i-CNMs and its possibility of application for biomaterials.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：カーボンナノ物質 インプラント インテリジェント化 カーボンナノホーン 単層カーボンナノチューブ 骨再生誘導法 骨形成 薬剤担持

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラントは広く臨床で使用されており、良好な予後も多数報告されているが、インプラント周囲炎への対応、高齢者や有病者など骨代謝活性が低下している患者への適応の拡大などについては、十分には解決されておらず臨床における大きな問題となっていた。申請者らはカーボンナノマテリアル(CNMs)が骨形成を促進することを明らかにしてきたが、インプラント等の材料へのCNMsの表面修飾や複合のみでは、前述の問題を十分に解決するには至らず、口腔領域を目的にした生体材料には、薬剤と機械・器具を組み合わせたいわゆるコンビネーションプロダクトの開発が喫緊の課題と考えた。また、CNMsに担持した薬剤や成長因子の徐放を制御することにより臨床での可能性はさらに高まるものと考えられた。加えて、これまでの基礎的研究の結果からインプラント、GBR膜などの多様な口腔領域の生体材料に対しては、同一のCNMs、また同一の処理法では、効果が不十分であり、使用目的に応じたCNMsの応用方法の開発が急務と考えた。しかしながら、CNMsのバイオ領域に関する研究は、DDSの担体、バイオセンサーの研究がほとんどであり、表面処理に関する研究、さらには高機能化を目的とした研究はなされていなかった。

2. 研究の目的

申請者らの最終的な目的は、高機能かつ機能発現を制御できるインテリジェントカーボンナノマテリアル(i-CNMs)を創製し、インプラントなどの医療用機器・材料と組み合わせ、口腔領域を対象とした革新的な生体材料(コンビネーションプロダクト)を開発することである。

本研究においては、以下の3つを目的とする。

- (1)担持した薬剤や成長因子の徐放制御の方法を確立し、i-CNMsを創製する。
- (2)インプラント、GBR膜などの材料に応じたCNMsの選択ならびに処理方法を確立するとともに、i-CNMsと材料を組み合わせ、動物実験を行い効果と安全性を確認する。

3. 研究の方法

(1)i-CNMsの創製と効果の検討

カーボンナノホーン(CNH)への薬剤(ミノサイクリン)の担持

ミノサイクリン(MC)1mgを蒸留水10mLに溶解し、MC水溶液を作製した。粉末状のCNHs(未酸化:as-CN、酸化:CNHox550)1mgにMC水溶液を添加し、冷水中にて2時間超音波分散を行った。これによりMC-CN複合体(MC/CNHs)を製作し、TEMにて観察した。吸光度測定・熱重量解析を行うことによりCNHsのMCの担持を確認し、CNHsの徐放能を検討するため、透析を行った。MC/CNHsの薬効を調べるため、細菌培養(*Streptococcus mutans* (Sm: ATCC 55677)および*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa: ATCC2952))を行う地とともに、細菌培養20時間後にSEM・TEM撮影を行った。さらに、MC/CNHsの骨芽細胞への影響を確認するため、増殖率とALP活性を計測した。

CNHへの共役拡張ポルフィリン(rTPA)の担持

同量のアミノ基修飾CNHs(CNH-NH₂)とrTPAをアミドカップリング試薬(DMT-MM)を加えたテトラヒドロフラン溶媒中で超音波にて分散し、4時間室温暗所にて攪拌した。2,2'-エチレンジオキシビスエチレンアミンを加え2時間さらに攪拌した後、反応溶液を脱イオン水で希釈した。これをPTFEフィルターにてろ過洗浄後、真空乾燥し、CNH-rTPAを得た。CNH-rTPAをジメチルスルホキシド(DMSO)に分散した後に生理食塩水にて希釈してCNH-rTPA分散液とし、LED光(波長730nm) Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG)を用いて¹O₂量を測定した。*Streptococcus mutans* (Sm: ATCC 55677)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa: ATCC2952)の懸濁液にCNH-rTPA分散液を添加し、LED光照射15分後のColony Forming Unit (CFU)および濁度をそれぞれ測定した。細胞毒性を検討するためにマウス胎児線維芽細胞(NIH)を4時間培養した後、CNH-rTPA分散液を添加して光照射し24時間後にWST1を用いて生存細胞数を比較した。

(2)インプラント、GBR膜などの材料に応じたCNMsの選択ならびに処理方法の確立と動物実験による効果と安全性の確認

チタン表面へのCNHの表面修飾

カルボキシル基を付与したCNHsを無水エタノールに分散し、CNH分散液を作成した。チタン板(純度99.5%,直径9mm,厚さ1mm)に陽極酸化処理を施し、CNH分散液中にて30mA/cm²の定電流下で、電圧と処理時間を変えて泳動電着を行った。各条件での電着後のSEM像からCNHsの付着面積を測定し比較し、FIB-SEMを用いて断面構造を観察した。最も均質に表面修飾された条件で処理されたCNH/AnTi板にヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞(Saos-2)を播種し、通法にて7日間培養した。培養後、SEMにて細胞の形態観察を行うとともにDNA量とALP活性の測定を行った。対照として陽極酸化処理チタン(AnTi)を使用した。また、Tiワイヤー(純度99.5%,直径1mm,長さ5mm)を同様に表面処理し、10週齢Wistar系雄性ラットの左側大腿骨骨髓腔内に埋入し、7および28日後に組織学的観察を行うとともに7日後の骨接触率を測定し、28日後の試料についてはTEM観察を行った。

単層カーボンナノチューブ(SWCNT)自立膜の開発

SWCNTs10mgをヒアルロン酸(HA)水溶液(0.1wt%)20ml中にて超音波処理を行い分散後に、孔径0.1 μ mのメンブレンフィルターを用いて吸引濾過し、乾燥後に剥離し、親水化処理を行い、CNT膜を製作した。SEM観察、接触角度の計測、膜中のHA量の定量、引張強度試験、CNT溶出試験、骨芽細胞、線維芽細胞、上皮細胞を用いた培養試験を行うとともに、GBR膜としての効果を検討するため、ラットの頭蓋冠に形成した骨欠損部をCNT膜にて被覆し(CNT群)術後8週で摘出し、 μ CTによる新生骨量の測定、非脱灰標本による組織学的検索、組織中へのCNTの拡散についてラマン分析を行った。欠損部を膜で被覆しないものを対照群とした。

4. 研究成果

(1) i-CNMsの創製と効果の検討

カーボンナノホーン(CNH)への薬剤(ミノサイクリン)の担持

CNHsをMC水溶液とともに超音波処理することで、CNHsの分散性向上とMC担持の可能性が示された。透析処理によるMC放出量の計測を行った結果、CNHsへの担持によりMCの放出量が減少すること、MC/as-CNHにおける24-48時間で顕著な溶出、MC/CNHox550での7日後まで微量の連続的溶出を確認し、CNHsの有無および前酸化処理に依存してMC放出量が変化することが明らかとなった。(図1)MC/as-CNHあるいはMC/CNHox550存在下において*S.m.*菌と*A.a.*菌の培養実験の結果、MC単体とMC/as-CNHでは同等の細菌増殖抑制効果を認められたのに対し、MC/CNHox550では効果の減弱が確認された。(図2)SEM観察において、死滅細菌を取り巻くようにCNHsが認められ、TEM観察では、死滅細菌の細胞壁に接するようにCNHsが認められた。(図3)以上より、MC/CNHox550ではMCの一部はCNH内部に存在していること、細菌抑制効果の減弱から、表面のMCが静菌効果を示し、内部に入り込んだMCは細菌増殖抑制効果には関与しないことが推察された。また、骨芽

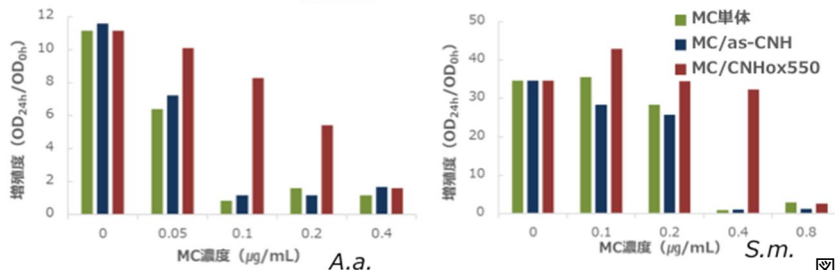
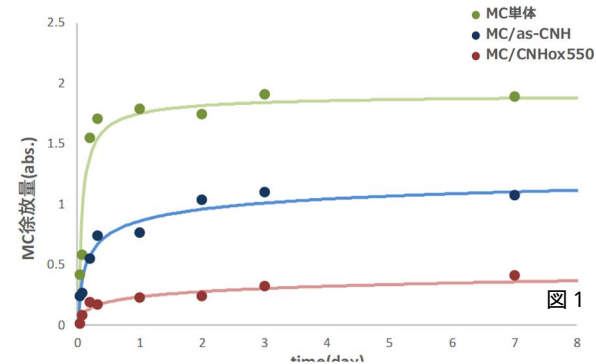


図2 された。また、骨芽

細胞培養7日後のDNA量、ALP活性は、MCおよびCNHsを添加していないコントロール群とas-CNH、CNHox550、MC/as-CNH、MC/CNHox550添加群との間に有意差はみられないことから、MCのCNHsへの担持による骨芽細胞の増殖および分化に対する影響は低いと考えられた。本研究の結果、MC水溶液にCNHsを添加することによりMCを担持したMC/CNHsを製作することが可能となった。MC-as/CNHsはMC単体と等しい静菌性を有していることが明らかとなり、局所応用の可能性が示された。

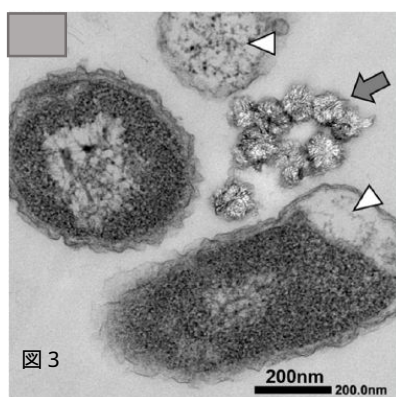


図3

Carbon 166 (2020) 36-45

関わらず菌数は変化しなかった。また、NIHの細胞数は、CNH-rTPA添加、光照射のいずれの条件下においても変化しなかった。CNH-rTPAは、近赤外光照射によって 1O_2 を発生しSmおよびAaに対して殺菌作用を有することが明らかとなった。

(2) インプラント、GBR膜などの材料に応じたCNMsの選択ならびに処理方法の確立と動物実験による効果と安全性の確認

チタン表面へのCNHの表面修飾

CNHsの付着面積は、電圧に比例して増加し、電圧300V、処理時間180秒においてCNHsの付着面積が最も高く、均一に固着した。FIB-SEM観察では、AnTi上に積層した200~300nmの厚さのCNHsを認めた。細胞培養実験において、AnTiと比較してCNH/AnTiに付着した細胞のDNA量は有意に上昇し、ALP活性は有意な変化がみられなかったことから、CNH表面処理により骨芽細胞様細胞の分

CNHへの共役拡張ポルフィリン(rTPA)の担持

SOSGによる 1O_2 量を経時的に測定したところ光照射15分後まで 1O_2 量は経時的に上昇した。CNH-rTPA添加・光照射群では、CNH-rTPA添加・光非照射群と比較して、Smは50%減少し、Aaは80%減少した。光非照射群では、CNH-rTPA添加の有無に

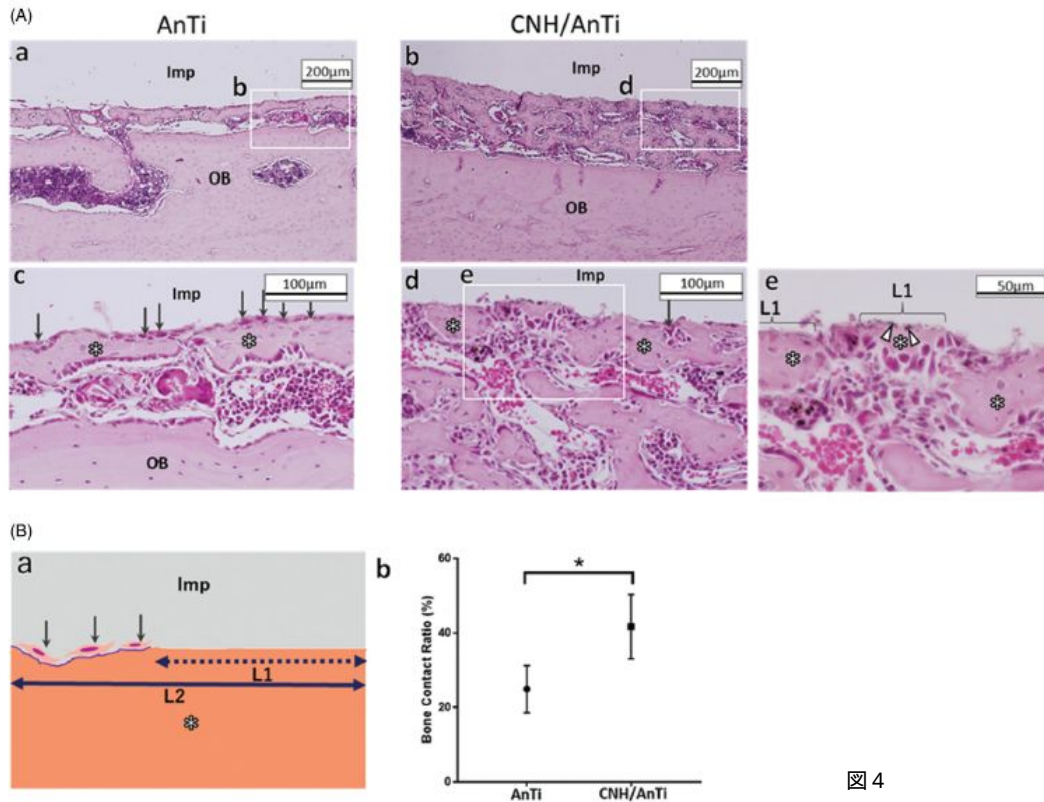


図 4

ARTIFICIAL CELLS, NANO MEDICINE, AND BIOTECHNOLOGY 2021,49,20-29

化には影響を与えないが、増殖を促進することが示された。骨髓腔埋入7日後では、AnTi、CNH/AnTiともに周囲に幼弱な新生骨組織が観察され、一部の新生骨は、CNHsと直接接していた。7日後のCNH/AnTiの骨接触率はAnTiに比較し有意に高かった。(図4)28日後において、一部のCNHsが骨基質と接していることがTEM観察にて明らかとなった。以上から、泳動電着法を用いてCNHsを陽極酸化チタン表面に均質に表面修飾することが可能であること、またCNH/AnTiは骨伝導性に優れ、新たなインプラント材料としての応用の可能性があることが示された。

単層カーボンナノチューブ(SWCNT)自立膜の開発

開発したSWCNT膜には、直径5-50nm程度の束状構造のSWCNTの緻密な網目構造が確認された。SWCNT 10mgあたり0.77mgのHAが担持され、接触角度は、16°、引張強度は、202.9N/mm²であった。SWCNT膜上の培養では、骨芽細胞のみが経時的に増殖し、線維芽細胞と上皮細胞の増殖は認められなかった。ラット埋入試験において、µCT解析によりSWCNT膜で被膜した骨欠損部には骨形成を示す不透過像が観察され、SWCNT群の不透過像は、対照群に比較し有意に多かった。(図5)組織学的には、対照群に比較してSWCNT膜で被覆された骨欠損部には活発な新生骨の形成が認められた。(図6)以上の結果より、本研究にて開発した

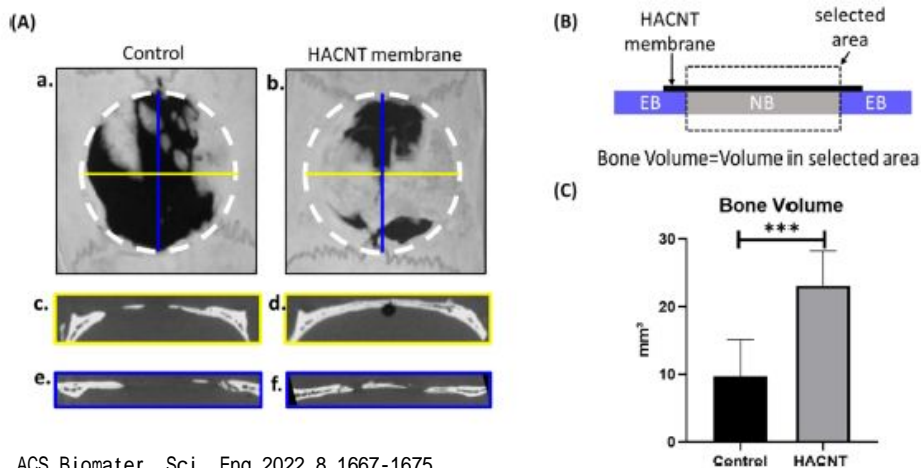
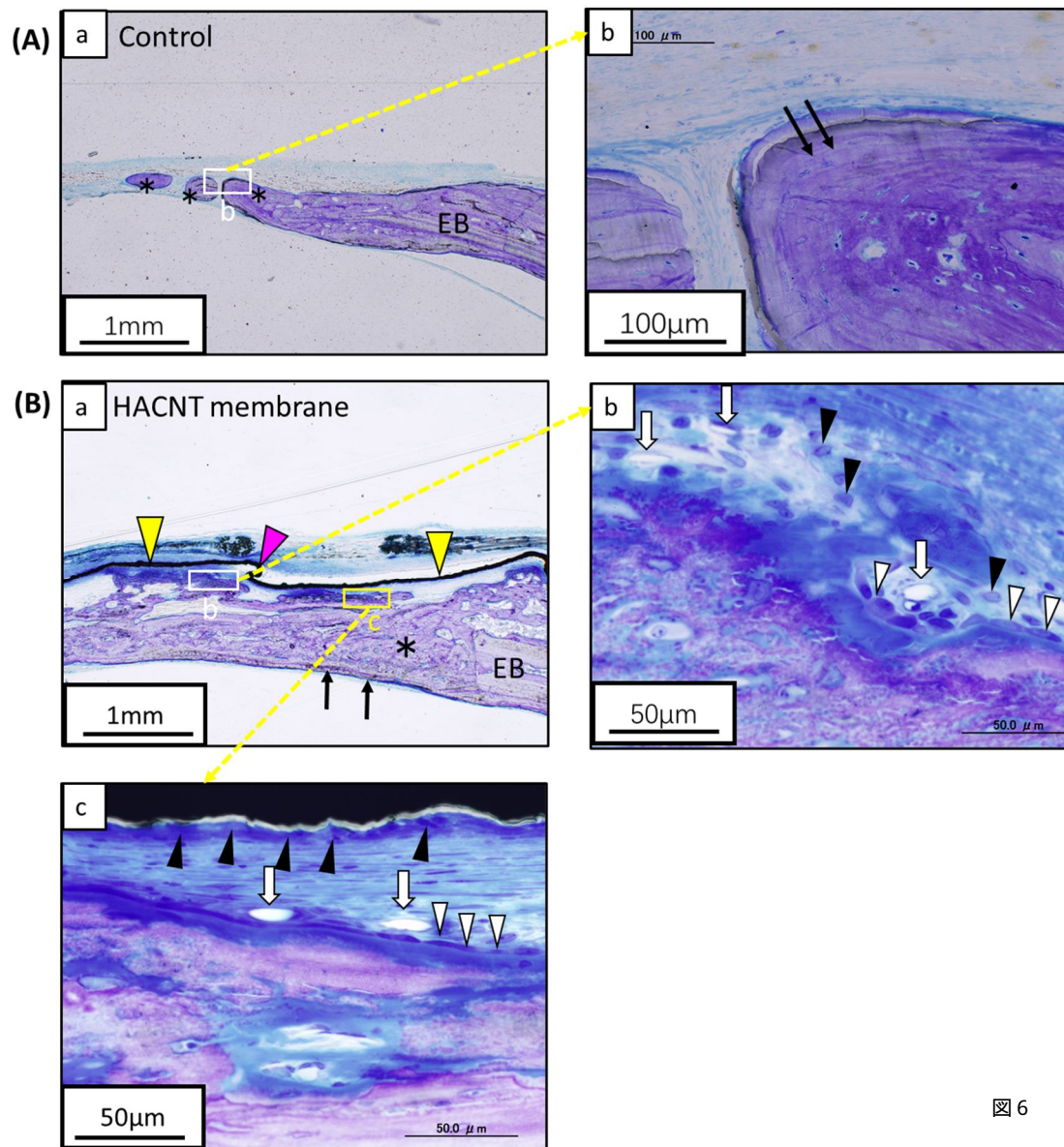


図 5

ACS Biomater. Sci. Eng.2022,8,1667-1675

SWCNT膜は、遮蔽性、スペースの確保に優れ、欠損部の骨形成を促進することが示され、GBR膜としての新たな可能性が示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maeda Yukari, Hirata Eri, Takano Yuta, Sakaguchi Norihito, Ushijima Natsumi, Saeki Ayumi, Kimura Sadahito, Shibata Ken-ichiro, Yudasaka Masako, Yokoyama Atsuro	4. 巻 166
2. 論文標題 Stable aqueous dispersions of carbon nanohorns loaded with minocycline and exhibiting antibacterial activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbon	6. 最初と最後の頁 36 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbon.2020.04.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takada Sari, Hirata Eri, Sakairi Masatoshi, Miyako Eijiro, Takano Yuta, Ushijima Natsumi, Yudasaka Masako, Iijima Sumio, Yokoyama Atsuro	4. 巻 49
2. 論文標題 Carbon nanohorn coating by electrodeposition accelerate bone formation on titanium implant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 20 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21691401.2020.1865388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Xu Yikun, Hirata Eri, Iizumi Yoko, Ushijima Natsumi, Kubota Keisuke, Kimura Sadahito, Maeda Yukari, Okazaki Toshiya, Yokoyama Atsuro	4. 巻 8
2. 論文標題 Single-Walled Carbon Nanotube Membranes Accelerate Active Osteogenesis in Bone Defects: Potential of Guided Bone Regeneration Membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 1667 ~ 1675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.1c01542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akasaka Tsukasa, Tamai Miho, Yoshimura Yoshitaka, Ushijima Natsumi, Numamoto Shinichiro, Yokoyama Atsuro, Miyaji Hirofumi, Takata Ryo, Yamagata Shuichi, Sato Yoshiaki, Nakanishi Ko, Yoshida Yasuhiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Different micro/nano-scale patterns of surface materials influence osteoclastogenesis and actin structure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nano Research	6. 最初と最後の頁 4201 ~ 4211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12274-021-4026-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 徐易坤、平田恵理、高田紗理、前田由佳利、木村貞仁、横山敦郎
2. 発表標題 骨再生誘導法への単層カーボンナノチューブ膜の応用
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yikun Xu、Eri Hirata、Yoko Iizumi、Yukari Maeda、Sadahito Kimura、Toshiya Okazaki、Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Fabrication and evaluation of single walled carbon nanotube membrane for guided bone regeneration application.
3. 学会等名 第11回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sadahito Kimura、Eri Hirata、Yuta Takano、Yukari Maeda、Masatoshi Sakairi、Masako Yudasaka、Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Exploration of macrophage polarization on titanium coated with carbon nanohorns.
3. 学会等名 第11回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田恵理、前田由佳利、木村貞仁、横山敦郎
2. 発表標題 光殺菌性カーボンナノホーンの開発
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村貞仁、平田恵理、 前田由佳利、横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾チタン上のM1-M2マクロファージの分極
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eri Hirata、 Yuta Takano、 Yukari Maeda 、 Sadahito Kimura、 Masako Yudasaka、 Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Development of antibacterial Carbon Nanohorns against peri-implantitis
3. 学会等名 第11回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徐易坤，平田恵理，木村貞仁，横山敦郎
2. 発表標題 骨再生誘導法への応用を目的とした単層カーボンナノチューブ膜の開発
3. 学会等名 第50回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yikun Xu , Eri Hirata , Toshiya Okazaki , Yoko Iizumi , Sadahito Kimura , Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Bone formation with the single wall carbon nanotube membrane
3. 学会等名 第10回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田由佳利, 平田恵理, 高田紗理, 木村貞仁, 横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーンに担持したミノサイクリンの静菌作用と徐放性
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第39回東北・北海道支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Occlusal considerations in dental implant therapy.
3. 学会等名 The 6th Indonesian Symposium of Implant Dentistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Hirata
2. 発表標題 The advantages of carbon nanomaterials for bone tissue engineering.
3. 学会等名 NT19 20th International Conference on the Science and Application of Nanotubes and Low-Dimensional Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞遮断遮蔽膜とその製造方法	発明者 平田恵理, 横山敦郎, 岡崎俊哉, 飯泉陽子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-083834	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤坂 司 (akasaka tsukasa) (00360917)	北海道大学・歯学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	山本 悟 (yamamoto satoru) (10344524)	北海道大学・歯学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	平田 恵理 (hirata eri) (10722019)	北海道大学・歯学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	高野 勇太 (takano yuta) (60580115)	北海道大学・電子科学研究所・准教授 (10101)	
研究分担者	湯田坂 雅子 (yudasaka masako) (70159226)	名城大学・理工学研究科・特任教授 (33919)	
研究分担者	岡崎 俊也 (okazaki toshiya) (90314054)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・副 研究センター長 (82626)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	前田 由佳利 (maeda yukari)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	木村 貞仁 (kimura sadahito)		
研究協力者	高田 紗理 (takada sari)		
研究協力者	飯泉 陽子 (iizumi yoko)		
研究協力者	坂口 紀史 (sakaguchi norhito) (70344489)	北海道大学・学内共同利用施設等・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	フランス国立科学研究所 (CNRS)			