

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390361
 研究課題名（和文）高機能化カーボンナノ物質修飾3次元スキャホールドを用いた顎骨組織の再建
 研究課題名（英文）Reconstruction of Jaw Bone with 3 dimension scaffold treated by functionalized carbon nano-material
 研究代表者 横山 敦郎 (YOKOYAMA ATSURO)
 北海道大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号：20210627

研究成果の概要（和文）：b-FGF を共有結合させることにより高機能化した多層カーボンナノチューブおよびスタチンを空間内に担持することにより高機能化したカーボンナノホーンを開発し、動物実験にてその骨形成を検討した。高機能化したカーボンナノマテリアルを用いることにより、通常のカーボンナノマテリアルに比較してより多くの骨形成が観察された。またカーボンナノマテリアルの生体内における長期的な経過についても動物実験によりその生体適合性を確認した。

研究成果の概要（英文）：Functionalized carbon nanomaterials were developed by covalent bond of b-FGF to multiwalled carbon nanotubes and absorption of simvastatin to carbon nanohorns, and effects of them on bone formation were evaluated by animal experiments. Extensive bone formation was observed in the scaffolds with functionalized carbon nanomaterials in comparison with normal carbon nanomaterials. Also, biocompatibility carbon nanomaterials was observed by animal experiments for a long term.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴・理工系歯学

キーワード：カーボンナノマテリアル、生体材料、骨形成、b-FGF、スタチン、チタン

1. 研究開始当初の背景

我々は、数年来カーボンナノ物質の医学・歯学領域への応用、特に再生医学への応用を目的に *in vitro*、*in vivo* での反応の解明やナノマテリアルを用いた生体材料の開発に取り組み、細胞毒性が低いこと、カーボンナノマテリアルの一種であるカーボンナノチューブ(CNTs)は骨芽細胞に強固に固着すること、さらにコラーゲンからなる3次元スキャ

ホールドにCNTsを表面修飾することは骨再生に有効であることを報告してきた。しかし、アスベストにおける中皮腫の様に曝露後長期間を経過した後に問題が生じることも考えられることから、長期的な安全性を解明することが必要であり、さらには骨再生のための生体材料としての応用を考えた場合、成長因子などによるナノマテリアルの高機能化が必要であることから本研究に着手した。

2. 研究の目的

上記のような状況を鑑み、以下を目的として本研究を行った。

(1) カーボンナノ物質を用いた生体材料の *in vivo* における長期的な安全性を解明する。

(2) カーボンナノ物質の高機能化するとともにこれらを用いた生体材料を開発する。

3. 研究の方法

(1) カーボンナノ物質の *in vivo* における長期的な反応の検討

①多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)

ラット皮下組織に MWCNTs の粉体を埋入し、2年経過した試料について TEM および HRTEM にて観察した。

②MWCNTs を表面修飾したコラーゲンスポンジ

ラット皮下組織および大腿骨骨髓腔に埋入し、組織学的検索また一部の試料については骨組織の組織計量を行った。

(2) MWCNTs の basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF) による高機能化

①MWCNTs と b-FGF の共有結合

N-ethyl-*N*-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride および *N*-hydroxysuccinimide を用いて b-FGF を MWCNTs に共有結合し、TEM および TAG にて確認した。

②b-FGF 高機能化 MWCNTs の評価

ラット大腿骨から採取した骨髄間質細胞を培養し、1および3日後の細胞増殖について検討するとともにコラーゲンスポンジに表面修飾し、ラット頭頂骨上に埋入し2週後に組織学的検討を行った。

(3) Carbon Nanohon(CNHs)のスタチンによる高機能化

①CNHs によるスタチンの担持

CNHs をアルコールに分散後、シンバスタチンを添加し吸引濾過により、PTFE 膜に固着した。CNHs のスタチンによる担持については TEM にて確認した。

②高機能化 CNHs の評価

ラット頭頂骨に直径 7mm の骨欠損部を形成し、スタチン担持 CNHs を固着した膜、CNHs のみ固着した膜にて被覆し、組織学的に検索するとともに、形成された骨量と TRAP 陽性細胞の数を計量した。また一部の試料については TEM および HRTEM 観察を行った。

(4) MWCNTs を用いたチタンへの表面処理

①MWCNTs のチタンへのコーティング

チタンを陽極酸化処理し、シランカップリングを行った後に、MWCNTs 分散液に浸漬することにより MWCNTs をチタンに固着した。

②MWCNTs コーティングチタンの評価につ

いて

骨芽細胞様細胞 Saos2 の培養特性を検索するとともに、ラット大腿骨内に埋入し、組織学的および組織軽量学的検索を行った。

4. 研究成果

(1) カーボンナノ物質の *in vivo* における長期的な反応

①多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)について

組織学的には、肉芽腫性炎を呈しており、マクロファージや異物巨細胞に貪食されている MWCNTs も観察された (図1)。

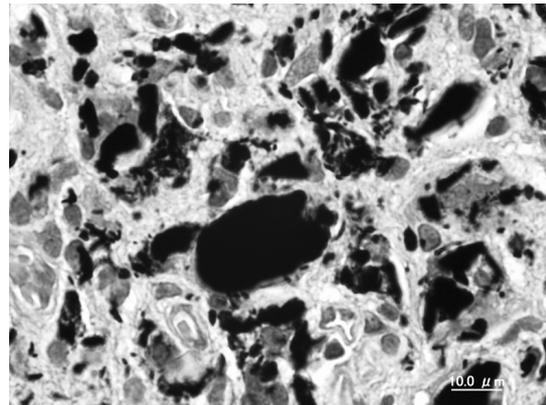


図1

HRTEM による観察から MWCNTs の凝集が弱くなりつつあることが示された。(図2)

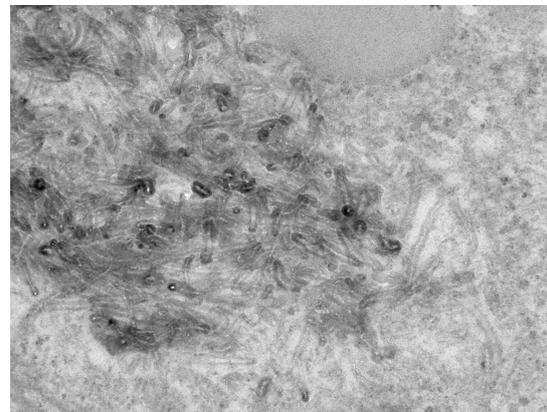


図2

②MWCNTs を表面修飾したコラーゲンスポンジについて

大腿骨骨髓腔内に埋入した場合、初期においては周囲に MWCNTs の周囲に骨組織が観察されたが、17か月後においては、骨組織は認められず、骨髓腔内に MWCNTs 凝集体が分散して観察された。(図3)

TEM 観察においては、凝集が分散しつつある像が観察された。(図4)

1年半、2年といった長期埋入においても強い炎症反応や腫瘍の形成は観察されず、MWCNTs の組織適合性が示唆された。

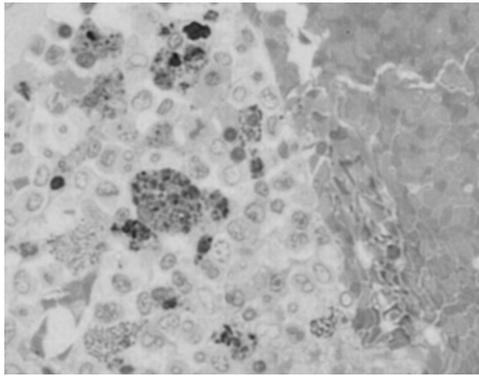


図 3

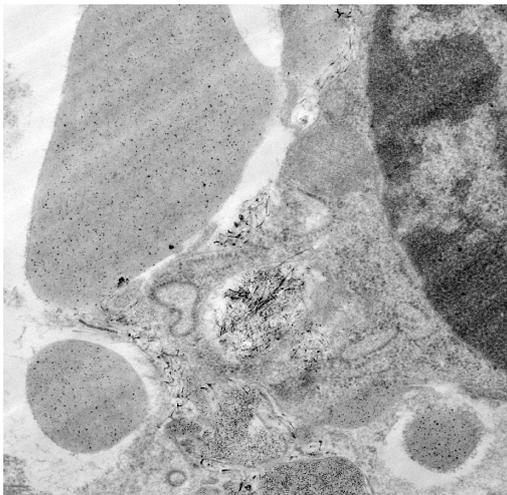


図 4

(2) MWCNTs の basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF) による高機能化

N-ethyl-*N'*-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride および *N*-hydroxysuccinimide を用いて b-FGF を MWCNTs に共有結合させることが可能であり、TEM 観察により b-FGF を共有結合させた後も MWCNTs の形態は変化しないことが明らかとなった。

b-FGF を修飾した MWCNTs を培地に添加した場合、PBS を添加した場合や MWCNTs のみを培地に添加した場合に比較し、骨髄間質細胞の増殖は促進されたが、b-FGF のみを加えた場合とほぼ同様であった。

b-FGF 修飾 MWCNTs をコラーゲンスポンジに均一にコーティングすることも可能であった。b-FGF 修飾 MWCNTs コラーゲンスポンジをラット頭頂骨上に埋入すると、b-FGF 添加コラーゲンスポンジや MWCNTs コートスポンジに比較してスポンジ内により多くの骨組織が形成されていた。

以上の結果から、b-FGF で修飾することにより MWCNTs を高機能化することが可能であり、生体材料への応用の可能性が示された。

(3) Carbon Nanohon(CNHs)のスタチンに

よる高機能化について

TEM 観察により CNHs にスタチンが担持されていることが確認できた。

スタチンを担持させた CNHs を固着した PTFE 膜で欠損部を被覆した群 (S-NH 群) および CNHs を固着した PTFE 膜で骨欠損部を被覆した群 (NH 群) のいずれにおいても、術後 2 週では未成熟な新生骨が中央部と欠損部辺縁に観察され、NH 群および S-NH 群の CNHs の一部は貪食細胞に貪食されていた。術後 8 週では S-NH 群において他の群に比較し多くの新生骨が認められ、TRAP 陽性細胞が膜に沿って観察された。(図 5) 欠損部における骨形成量は、2 週では 3 群の間に有意差は認められなかったが、8 週では、S-NH 群において NH 群や欠損部を放置した群 (C 群) に比較し有意に高い値を示した。

(図 6 左 NH 群、右: S-NH 群) TRAP 陽性細胞数は、8 週においては S-NH 群のほうが NH 群に比較し有意に多かった。超微細構造学的観察においては、CNHs を貪食する破骨細胞様細胞や一部に不鮮明な構造を示す CNHs が認められた。

以上の結果から CNHs からのシンバスタチンの徐放が明らかとなり、貪食細胞によるシンバスタチン担持 CNHs の貪食の関与が推察された。

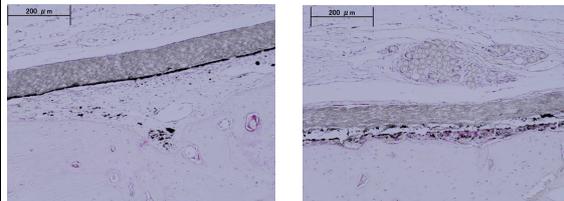


図 5

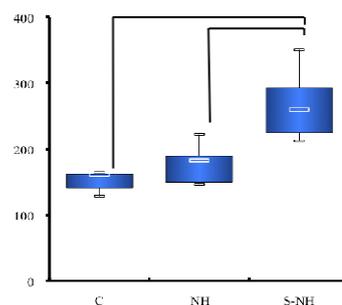


図 6

(4) MWCNTs を用いたチタンへの表面処理について

MWCNTs を陽極酸化チタンに均一にコーティングすることが可能であった。(図 7) MWCNTs をコーティングした CNT-Ti ディスク上で Saos2 は良好に伸展、増殖していた。CNT-Ti ディスク上の DNA 量は、Ti ディスクと比較し有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

(図8) ALP 活性において両者の間に差は認められなかった。光学顕微鏡による観察では、埋入後2週においてMWCNTsをコーティングしたCNTs-TiワイヤーおよびTiワイヤー表面に骨組織が直接接しているのが観察された。(図9)組織計量においては、CNT-Tiワイヤーの骨接触率はTiワイヤーに比較し高い値を示した。EDSの結果から、チタン表面上におけるCNTsの存在およびCNTsと骨との接触が示唆された。

以上の結果から、陽極酸化チタンに対する多層カーボンナノチューブによる表面修飾は骨伝導性を向上することが示唆された。

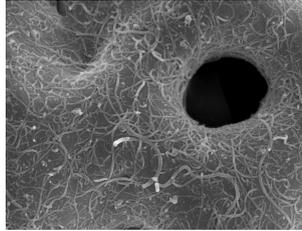


図7

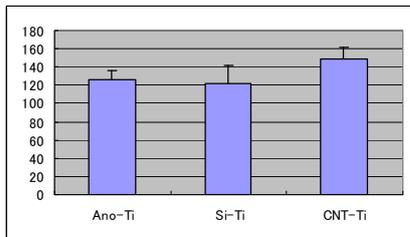


図8

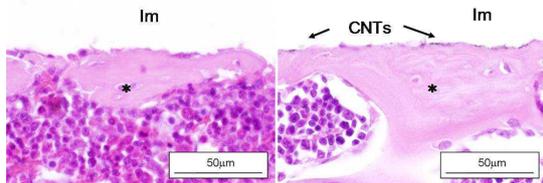


図9

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7件)

① Hirata E, Uo M, Takita H. Akasaka T. Watari F, Yokoyama A. Multiwalled carbon nanotube-coating of 3D collagen scaffolds for bone tissue engineering. Carbon, 49:3284-91, 2011 査読あり

② Kasai T, Matsumura S, Iizuka T, Shiba T. Kanamori T, Yudasaka M. Iijima S, Yokoyama A. Carbon nanohorns accelerate bone

regeneration in rat calvarial bone defect. Nanotechnology, 22:065102, 2011 査読あり

③ Akasaka T. Yokoyama A. Matsuoka M, Hashimoto T, Watari F. Maintenance of hemiround colonies and undifferentiated state of mouse induced pluripotent stem cells on carbon nanotube-coated dishes. Carbon, 49:2287-2299, 2011 査読あり

[学会発表] (計18件)

① Hirata E Functionalization of carbon nanotubes by fibroblast growth factor The 2nd symposium of carbon nanofoms 平成24年7月17日産総研(茨城県)

② 横山敦郎 補綴領域におけるナノテクノロジーの展望 日本補綴歯科学会東北・北海道、関越、東関東合同支部会(招待講演) 平成23年9月24日新潟県歯科医師会館(新潟)

③ 横山敦郎 ナノバイオマテリアルの開発と評価における医工連携 日本補綴歯科学会第119回学術大会(招待講演) 平成22年6月13日東京ビッグサイト(東京)

[図書] (計1件)

ナノ材料のリスク評価と安全性対策. 一生体・環境への影響、安全性対策・国内外動向— 亘理文夫 編, 第2章 ナノ材料の生体への影響. フロンティア出版, 29-34 ページ 2010年6月

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

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)

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 敦郎 (Yokoyama Atsuro)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20210627

(2)研究分担者

赤坂 司 (Akasaka Tsukasa)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：00360917
山本 悟 (Yamamoto Satoru)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：10344524
滝田 裕子 (Takita Hiroko)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30125330
佐藤 義倫 (Sato Yoshinori)
東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
研究者番号：30374995
安田 元昭 (Yasuda Motoaki)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：90239765

(3)連携研究者

芝 清隆 (Shiba Kiyotaka)
癌研究所・タンパク創製研究部・部長
研究者番号：40196415
湯田坂 雅子 (Yudasaka Masako)
産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・チーム長
研究者番号：70159226
坂口紀史 (Sakaguchi Norihito)
北海道大学・附属エネルギー・マテリアル融合領域研究センター・准教授