

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18201021
 研究課題名（和文） 人工関節のための新規生体材料であるカーボンナノチューブ・セラミックス複合体の開発
 研究課題名（英文） Development of carbon nanotube/ceramic composites as new biomaterials for artificial joint
 研究代表者
 齋藤 直人（SAITO NAOTO）
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号：80283258

研究成果の概要（和文）：人工関節において現在最も改良が期待されている摺動部材のセラミックスについて、カーボンナノチューブ（CNT）を用いた新規複合体の開発を行った。高分散処理したCNTを高純度アルミナ粉末と混合し、真空焼結とHIP処理の併用やプラズマ焼結することにより複合体を作製した。CNTが均一混合した緻密な複合体が得られ、高強度、高靱性を示した。また、CNTを生体材料として用いる場合に重要な生体適合性を評価し、CNTおよびその複合体は生体親和性が高く、生体材料として有害な事象を示さなかった。

研究成果の概要（英文）：We attempted to develop new composites using carbon nanotubes (CNTs) with ceramics as sliding components for artificial joint. High dispersion-treated CNTs were mixed with high purity alumina powder and consolidated by vacuum sintering and HIP treatment or by plasma sintering. As the results, dense composites were obtained and showed high bending strength and high fracture toughness. When CNTs are used as a biomaterial, safety is important. The results indicated that CNTs has high biocompatibility and no harmful effects, as a biomaterial.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2007年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
総計	39,700,000	11,910,000	51,610,000

研究分野：生体材料

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：生体材料、カーボンナノチューブ、セラミックス、複合体、人工関節

1. 研究開始当初の背景

CNTは、日本人研究者により研究開発が進み、国際的に高い評価を得ている日本発の新素材である。CNTはきわめて高い強度を持ちながら柔軟性があり、他の材料と複合しても安定している特性をもつ。このためセラミックスと複合させると、従来のセラミックスと

比較して強度が飛躍的に向上する可能性がある。またCNTは、弾力性が向上する、表面の粘着性が向上するなど、人工関節の摺動部に応用した場合に有利な特性を生じる可能性がある。このように、CNTとセラミックスの複合体は新規の材料で多くの新しい可能性を有しており、本研究はこれを生体材料と

して用いる独創的な試みである。本研究開発により CNT/セラミックス複合材料が実用化され、優れた人工関節を誕生させることができれば、人工関節手術を受ける患者数が急増している現在、社会的に大きな意義がある。さらに国内のみならず、国外製人工関節にも高性能の新規セラミックス材料を供給することが可能で、ほとんどが輸入品で占められている人工関節市場において、初めて国際競争力のある製品を創生することができる。

2. 研究の目的

(1) アルミナが有する優れた生体親和性、耐磨耗性、化学的安定性などの利点を保ちながら強度および破壊靱性を向上させることを目的に、強化材として CNT (多層カーボンナノチューブ) を母材のアルミナへ複合化させる。CNT が均一分散した緻密な複合体を試作し、機械的物性評価を行い、破壊しにくい長寿命の新規セラミック人工関節材料の開発を試みる。

(2) CNT とセラミックスの複合体を生体材料として用いるために、CNT そのものとその複合体の生体適合性を評価する。特に人工関節は骨と接する生体材料であるため、骨組織反応を詳細に評価する。これは人工関節にとどまらず、今後急速に進展すると予想される CNT を生体材料に応用する研究の基盤となる研究である。

3. 研究の方法

(1) 素材研究と機能評価

CNT は疎水性であり、分子間力が大きいいため、アルミナなどの親水性のセラミックスと混合すると CNT 凝集体ができやすい。また、CNT のなかには互いに絡み合う CNT 凝集体が存在し、それを分散した状態にするのは困難である。CNT 凝集体がセラミックス中に存在すると、CNT が強化材として機能しないだけでなく、セラミックスの強度を低下させる。そこで、本研究では、CNT をアルミナセラミックスへ高度に均一分散混合させるために、CNT に対し衝撃力やせん断力などの機械的な応力などを利用した超微細化処理を行った。なお、CNT には気相成長炭素繊維 VGCF-S(昭和電工製、繊維径 80nm、繊維長 10-20 μ m)を用いた。

超微細化処理した CNT を 0.4-1.6wt% となるように高純度アルミナ粉末とボールミル混合し、整粒および静水圧成形した。得た成形体を真空焼成と HIP 処理の併用により、また、整粒した混合粉末をプラズマ焼結法により複合体とした。

(2) 生体適合性の研究

① 生体反応評価: CNT 単体およびアルミナ複合体を実験動物の皮下組織に埋め込み、経時的に周囲組織とともに摘出する。摘出した試

料の変化を観察する。周囲組織は組織標本を作製し、炎症所見や血流状態を観察して、生体反応を評価する。

② 骨組織反応評価: 実験動物の骨に骨孔をあけ、CNT 単体およびアルミナ複合体を骨孔に挿入する。経時的に母床の骨とともに摘出する。摘出したピースの変化を観察する。母床の骨は軟 X 線写真および組織標本で評価する。

③ 細胞反応評価: CNT およびその複合体に対する細胞反応を様々な培養細胞を用いて評価する。細胞毒性試験を適切なコントロールと比較して実施する。特に線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞に対する反応が明らかにする。また、生体反応として重要なマクロファージに対する反応も評価を行う。

④ 抗菌性試験: 細菌を培養したシャーレ内に CNT を設置し、菌の増殖を評価する。

4. 研究成果

(1) 素材研究と機能評価

① 真空焼成および HIP 処理による焼結

真空焼成により得られた複合体の相対密度は CNT 添加量が多いほど相対密度が低く、CNT がアルミナの緻密化を阻害することを示した。HIP 処理すると 0.4 と 0.8wt% CNT 添加複合体は相対密度が 99% 以上の高密度になったが、1.6wt% 添加では、逆に密度が低下した。複合体中で CNT はアルミナ粒子間に均一分散していたが、一部の CNT は粒界に集合体を形成していた(図 1 (a))。このような集合体のなかには、焼成前に均一分散していた CNT がアルミナの粒成長に伴って移動したことにより形成したものもあると考えられる。また、CNT とアルミナ粒子の界面は密着していた(図 1 (b))。

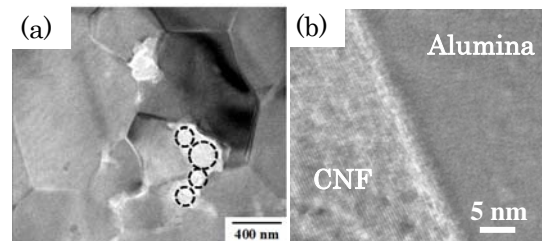


図 1 複合体の TEM 写真

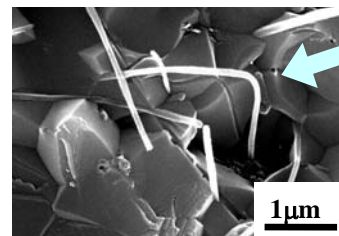


図 2 複合体の SEM 写真

CNT 添加複合体中には SEM 写真(図 2)の矢印で示すように、屈曲した CNT もみられた。このような CNT の屈曲はセラミック繊維やウ

イスター、通常の炭素繊維にはみられない CNT のユニークな性質の一つといえる。

② プラズマ焼結

1.6~2.5wt% CNT 添加複合体はプラズマ焼結することで、相対密度が 99%以上で達した。これはプラズマ焼結の特徴である、急速昇温、短時間の焼結、加圧、そして粒子間におけるプラズマの発生によるものである。

③ 機械的性質評価

複合体の平均の曲げ強度は、コントロールの高純度アルミナの平均の曲げ強度よりも低下した。一方、曲げ強度の平均値は、5本の試験片の強度から求めたものであるが、そのなかの最高の強度は 1314MPa で、高純度アルミナの最高の強度 1256MPa よりも高かった。このように、高純度アルミナよりも高い強度の複合体を作製できる可能性が示された。複合体の破壊靱性は最高値で $6.0 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{0.5}$ が得られ、高純度アルミナの破壊靱性に対し 71%の向上を示した。この向上は CNT のプルアウトおよびブリッジングによるものであった。

複合体の破壊靱性 (K_{IC}) はアルミナの平均粒径 (G) が小さくなるほど、大きくなった (図 3)。これは、粒径が小さいほど CNT の屈曲が多くなり、それにより CNT がアルミナマトリックスからプルアウトする抵抗が大きくなったためと考えられる。また、 K_{IC} と G は次式で表すと、直線関係が得られた。

$$K_{IC} = k_1/G^2 + k_2 \quad (k_1, k_2 : \text{定数})$$

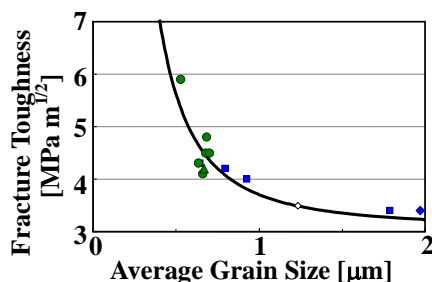


図 3 破壊靱性とアルミナ平均粒径の関係

④ まとめ

本研究では、0.8wt%の CNT が均一分散した複合体を、真空焼成と HIP 処理の併用により相対密度 99%以上にまで緻密化する技術確立した。また、CNT はアルミナの粒成長に伴い、移動して粒界に集合すること、および CNT が屈曲する場合もあることを明らかとした。複合体の曲げ強度は最高で 1GPa 以上となり、高純度アルミナの強度よりも低かったが、報告されている複合体の強度の中では最高値を示した。複合体の破壊靱性は高純度アルミナに対して 71%の向上を示した。この結果は、報告されている多くの複合体と大差なく、チャンピオン値 (約 $9 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{0.5}$) より低い。しかし、本研究では、破壊靱性とアルミナ粒径の関係をはじめで見出した (図 3)。

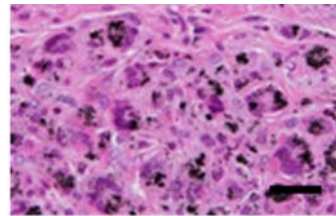
今後は、複合体の機械的性質と微構造変化

に与える CNT の添加量、種類 (繊維径)、表面処理などの影響をさらに検討し、複合体の微構造と機械的性質の関係を明らかにする。また、強度の向上には、わずかに存在する CNT 凝集体や焼結不良部分の除去が必要であるが、その技術的手法を確立する必要がある。

(2) 生体適合性の研究

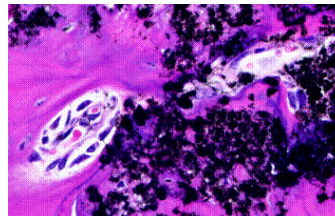
① 生体反応評価

CNT をマウス皮下に埋め込み、1~24 週で摘出し、組織学的に評価した。CNT は埋植直後から強い炎症反応を惹起せず、マクロファージに取り込まれていた。その後も CNT はマクロファージに取り込まれたままで安定し、炎症反応は消失した。CNT の皮下組織との適合性は良好であった。また、CNT/セラミックス複合体を皮下に埋め込み、同様の評価を行った。結果は母材単独と同様の組織所見を示し、炎症反応などを引き起こさなかった (図)。



② 骨組織反応評価

CNT を頭蓋骨の骨膜下に埋植すると、炎症反応が軽く母床の骨を侵食しなかった。次に、脛骨の骨孔に CNT を埋植し、短期、中期、長期評価を行った。CNT を骨孔に埋め込んでも正常な骨修復が起こり、修復した骨組織に CNT が取り込まれた (図)。

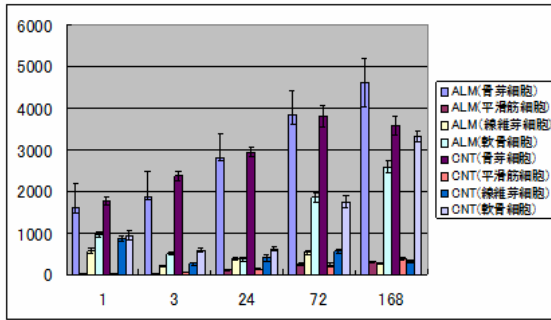


また、CNT/セラミックス複合体を骨孔皮下に埋め込み、同様の評価を行った。結果は母材単独と同様の組織所見を示した。

この研究過程において、CNT が生体内で骨形成を促進する新事実を発見し、骨組織再生の足場材に適していることを明らかにした。

③ 細胞反応評価

チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞に CNT およびカーボンブラックを作用させて培養し、1 週間後コロニー形成数を計測した。CNT の細胞毒性は、生体安全性の立証されているカーボンブラックと同等であった。この結果は、CNT を生体材料に応用するためにきわめて重要である。また、CNT 複合体上で細胞培養を行い、細胞接着および増殖が母材と変わらないことを確認した (図)。



さらに、生体内埋め込み試験でCNTがマクロファージ取り込まれて長期間安定することがわかったため、培養マクロファージに作用させて反応を評価した。結果は、CNTを取り込んだマクロファージは炎症性サイトカインを誘導しなかった。

この研究過程において、CNTが破骨細胞の機能を抑制すること、骨形成時の石灰化を促進することを分子レベルから明らかにした。

④ 抗菌性試験

CNTを生体材料に応用する場合、抗菌性を有していれば、有用な特性である。黄色ブドウ球菌培養液に濃度を3段階に変えたCNT液を添加して、一定時間培養した後に細菌数を測定した。結果は、CNTを添加すると濃度に依存して細菌数が減少した。

⑤ まとめ

CNTおよびその複合体は、生体親和性が高く、生体材料として有害な事象を示さなかった。現在国際的に急速に進展している、CNTを生体材料に応用する研究の基盤となる成果を挙げられたと考える。また、本研究過程において、CNTが骨形成を促進する予想外の発見をし、その機序を分子レベルから解明することができた。

本研究成果には一部NEDO「ナノテク・先端部材実用化研究開発：ナノバイオテクノロジーによる高機能人工関節摺動部材の研究開発」による研究成果が含まれる。

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9件)

- ① Saito N, Usui Y, Aoki K, Narita N, Shimizu M, Hara K, Ogiwara N, Nakamura K, Ishigaki N, Kato H, Taruta S, Endo M. Carbon nanotubes: biomaterial applications. *Chem Soc Rev* 38(7): 1897-1903, 2009. 査読有
- ② Aoki K, Usui Y, Narita N, Ogiwara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Sano K, Ogiwara N, Kametani K, Kim C, Taruta S, Kim YA, Endo M, Saito N. A thin carbon fiber web as a scaffold for bone tissue

regeneration. *Small* 5(13): 1540-1546, 2009. 査読有

- ③ Narita N, Kobayashi Y, Nakamura H, Maeda K, Ishihara A, Mizoguchi T, Usui Y, Aoki K, Shimizu M, Kato H, Ozawa H, Udagawa N, Endo M, Takahashi N, Saito N. Multi-walled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. *Nano Lett* 9(4): 1406-1413, 2009. 査読有
- ④ Saito N, Usui Y, Aoki K, Narita N, Shimizu M, Ogiwara N, Nakamura K, Ishigaki N, Kato H, Taruta S, Endo M. Carbon nanotubes for biomaterials in contact with bone. *Curr Med Chem* 15(5): 523-527, 2008. 査読有
- ⑤ Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Nakamura K, Ishigaki N, Yamazaki H, Horiuchi H, Kato H, Taruta S, Kim YA, Endo M, Saito N. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effect. *Small* 4(2): 240-246, 2008. 査読有
- ⑥ Taruta S, Fujisawa R, Kitajima K. Preparation and mechanical properties of machinable alumina/mica composites. *J Eur Ceram Soc* 26: 1687-1693, 2006. 査読有

[学会発表] (計57件)

- ① Saito N. Carbon nanotubes: Biomaterial applications and safety. 3rd International Workshop on CNT's Toxicology and Safety, Nagano, Japan, February 16, 2010. (Workshop)
- ② Usui Y, Aoki K, Shimizu M, Ogiwara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Endo M, Saito N. Carbon Nanotubes Show High Bone Tissue Compatibility. 22nd European Conference on Biomaterials (ESB2009), Lausanne, Switzerland, September 7-11, 2009.
- ③ Aoki K, Hara K, Narita N, Usui Y, Shimizu M, Ogiwara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Todoroki H, Ito I, Endo M, Saito N. Mechanical Properties and Bone Tissue Compatibility of Polyethylene / Multi-Walled Carbon Nanotube Composite. 22nd European Conference on Biomaterials, (ESB2009), Lausanne, Switzerland, September 7-11, 2009.
- ④ Aoki K, Usui Y, Hara K, Narita N, Shimizu M, Ogiwara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Taruta S, Kim YA, Endo M, Saito N. Biocompatibility of thin carbon fiber web as a scaffold for bone regeneration.

- 4th International Conference on Nanotechnology–Occupational and Environmental Health, Helsinki, Finland, August, 26–29, 2009.
- ⑤ Usui Y, Aoki K, Shimizu M, Ogiwara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Endo M, Saito N. Multi-walled Carbon nanotubes show high bone tissue compatibility. 4th International Conference on Nanotechnology–Occupational and Environmental Health, Helsinki, Finland, August, 26–29, 2009.
- ⑥ Aoki K, Usui Y, Hara K, Narita N, Simizu M, Ogiwara N, Nakamura K, Ishigaki N, Kato H, Kim YA, Taruta S, Endo M, Kobayashi Y, Saito N. Bone Tissue Compatibility of Carbon Nanotubes. 2nd International Workshop on CNT's Toxicology and Safety (IWCTS), Nagano, June, 22, 2009. (Workshop)
- ⑦ Aoki K, Usui Y, Endo M, Saito N. Biocompatibility of carbon nanotubes. Workshop of the safety assessment of the carbon nanotubes in American National Institute for Occupational Safety and Health, and the Environmental Protection Agency, West Virginia, USA, February 26–27, 2009.
- ⑧ Narita N, Usui Y, Aoki K, Simizu M, Kato H, Saito N, Kobayashi Y, Nakamura H, Maeda K, Ishihara A, Mizoguchi T, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N, Endo M. Multi-walled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. NanoEurope 2008, St. Gallen, Switzerland, September, 16–17, 2008.
- ⑨ Narita N, Kobayashi Y, Nakamura H, Maeda K, Mizoguchi T, Kato H, Ozawa H, Udagawa N, Endo M, Takahashi N, Saito N. Multi-walled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. 30th the American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, Montreal, Canada, September 12 - 16, 2008.
- ⑩ Taruta S, Yamaguchi T, Kitajima K, Usui Y, Aoki K, Endo M, Saito N. Fabrication of carbon nano-fiber/almina composites by vacuum sintering and hot isostatic pressing. Carbon 2008, Nagano, July, 13–18, 2008.
- ⑪ Narita N, Kobayashi Y, Nakamura H, Maeda K, Ishihara A, Mizoguchi T, Usui Y, Aoki K, Simizu M, Kato H, Ozawa H, Udagawa N, Endo M, Takahashi N, Saito N. Multi-walled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. Carbon 2008, Nagano, July, 13–18, 2008.
- ⑫ Usui Y, Aoki K, Narita N, Nakamura K, Ishigaki N, Kato H, Kim YA, Taruta S, Endo M, Saito N. Carbon nanotubes show high bone tissue compatibility and accelerate bone formation. Carbon 2008, Nagano, July, 13–18, 2008.
- ⑬ Aoki K, Usui Y, Kato H, Kim YA, Endo M, Saito N. A thin carbon fiber web as a scaffold for bone tissue regeneration. Carbon 2008, Nagano, July, 13–18, 2008.
- ⑭ Aoki K, Narita N, Shimizu M, Usui Y, Ogiwara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Kim YA, Taruta S, Endo M, Saito N. Development of novel carbon fiber sheet as a scaffold for bone regeneration. 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, May 28 - June 01, 2008.
- ⑮ Saito N. Carbon nanotube compatibility with Bone Tissue. INNO.08, Montreal, April, 21–23, 2008.
- ⑯ Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura K, Nakamura I, Ishigaki N, Yamazaki H, Horiuchi H, Kato H, Taruta S, Endo M, Saito N. Carbon nanotubes show high bone tissue compatibility. 6th Combined Meeting of the Orthopaedic Reserch Societies, Honolulu, October, 20–24, 2007.
- ⑰ Aoki K, Narita N, Usui Y, Ogiwara N, Ishigaki N, Nakamura K, Murakami N, Nakamura I, Kato H, Kim YA, Taruta S, Endo M, Saito N. Development of novel carbon fiber sheet as a scaffold for bone regeneration. 6th Combined Meeting of the Orthopaedic Reserch Societies, Honolulu, October, 20–24, 2007.
- ⑱ Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Ishigaki N, Yamazaki H, Horiuchi H, Kato H, Taruta S, Endo M, Saito N. Carbon nanotubes show high bone tissue compatibility and accelerate bone formation in vivo. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Santas Clara, May 20–24, 2007.
- ⑲ Aoki K, Narita N, Usui Y, Kato H, Kim YA, Endo M, Saito N. Development of novel carbon fiber sheet as a scaffold for bone regeneration. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Santas Clara, May 20–24, 2007.
- ⑳ Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Ishigaki N, Yamazaki H, Horiuchi H, Kato H, Taruta S, Endo M, Saito N. Carbon nanotubes show high bone

tissue compatibility and accelerate bone formation in vivo. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Santos Clara, May 20-24, 2007.

[図書] (計4件)

- ① Saito N, Aoki K, Usui Y, Shimizu M, Hara K, Narita N, Ogiwara N, Nakamura K, Ishigaki N, Kato H, Hanyiu H, Kim C, Taruta S, Kim YA, Endo M: Thin carbon fiber web that functions as a scaffold for tissue regeneration. In: Columbus NG (ed), Tissue regeneration and repair: procedures, clinical implications and applications, Nova Science Publishers, Inc., New York. 2010. (in press)
- ② Saito N, Usui Y, Aoki K, Narita N, Shimizu M, Hara K, Ogiwara N, Nakamura K, Ishigaki N, Kato H, Haniu H, Taruta S, Endo M: Application of carbon nanotubes on scaffolds for bone tissue regeneration. In: Legard V, Schluter R (eds), Bone regeneration: growth factors, augmentation procedures and tissue engineering applications, Nova Science Publishers, Inc., New York. March 2010.
- ③ Saito N, Murakami N, Takaoka K: New technology for bone tissue regeneration using cytokines and their drug delivery systems. In: Mashkevich B0 (ed), Drug delivery research advances, pp227-241, Nova Science Publishers, Inc., New York. December 2007.

[その他]

- ① Nature Publishing Group, Asia Materials (平成21年6月29日)
<http://www.natureasia.com/asia-materials/highlight.php?id=469>
- ② 信濃毎日新聞 (朝刊) 平成21年7月8日 (1面) 掲載
- ③ 信濃毎日新聞 (朝刊) 平成20年2月21日 (1面) 掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 直人 (SAITO NAOTO)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80283258

(2) 研究分担者

遠藤 守信 (ENDO MORINOBU)
信州大学・工学部・教授
研究者番号：10021015

樽田 誠一 (TARUTA SEIICHI)
信州大学・工学部・教授
研究者番号：00217209

加藤 博之 (KATO HIROYUKI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：40204490

堀内 博志 (HORIUCHI HIROSHI)
松代総合病院・整形外科・部長
研究者番号：80377639

天正 恵治 (TENSHO KEIJI)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：20419378

石垣 範雄 (ISHIGAKI NORIO)
信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)
研究者番号：20447725

中村 恒一 (NAKAMURA KOUICHI)
信州大学・医学部附属病院・
助教 (特定雇用)
研究者番号：80419382

川久保 洋一 (KAWAKUBO YOICHI)
信州大学・工学部・教授
研究者番号：40313829

薄井 雄企 (USUI YUKI)
信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)
研究者番号：00467169

青木 薫 (AOKI KAORU)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30467170

清水 政幸 (SHIMIZU MASAYUKI)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40467171

荻原 伸英 (OGIWARA NOBUHIDE)
信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)
研究者番号：40447727

原 一生 (HARA KAZUO)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：00532045