

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19390488

研究課題名 (和文) カーボンナノチューブを三次元スキャホールド及び表面修飾として用いた口腔組織の再建

研究課題名 (英文) Oral Tissue Reconstruction with 3D Scaffolds and Surface Modification Using Carbon Nanotubes

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)：カーボンナノチューブ(CNTs)を用いた顎骨再建を目的として、本研究ではハニカム構造を持つコラーゲンスポンジ表面に CNTs をコーティングし、細胞培養用三次元スキャホールドを開発した。CNTs コーティングにより、骨芽細胞のスキャホールドへの初期接着は促進され、特にスキャホールド深部での細胞の接着、伸展に有効であることが示された。また、CNTs コーティングスキャホールドを骨内に埋入したところ、良好な骨伝導性が認められたことから顎骨再生への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we developed 3D collagen scaffolds coated with carbon nanotubes to reconstruct jaw bone. It was shown that initial adhesion and spreading of osteoblastic cells on 3D collagen scaffold was accelerated by CNTs coating, especially center part of scaffold. Also, it was suggested to apply CNTs for reconstruction of jaw bone, because excellent osteoconductivity was observed when 3D collagen scaffolds coated with CNTs were implanted in bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,100,000	1,830,000	7,790,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,450,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：7405

キーワード：カーボンナノチューブ、三次元スキャホールド、表面修飾、骨芽細胞、コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

化学的、物理的性質から多くの分野でカーボンナノチューブ(CNTs)は注目され、研究が進められてきたが、医学領域においては研究が端緒についたばかりであり、不明な点が多

い。我々は、CNTs の生体材料への応用を目的に、材料の精製、生体適合性の検索、さらには細胞培養への応用を行ってきた。顎骨再建のための生体材料の開発を考えた場合、CNTs を用いた三次元のスキャホールドの開

発や表面修飾が必要と考え、本研究を考案した。

## 2. 研究の目的

我々の研究の最終的なCNTsに代表されるカーボンナノ物質を生体材料として顎骨をはじめとする口腔組織の再生医療に応用することであるが、本研究においては以下の3点を目的とした。

- (1) CNTsの生体適合性を評価する
- (2) CNTsを用いた細胞培養用三次元スキャホールドの開発
- (3) CNTsの表面処理への応用

## 3. 研究の方法

### (1) CNTsの生体適合性の評価

多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)をラット皮下、骨膜下に埋入し、経時的に光学顕微鏡による組織学的検索、透過型電子顕微鏡による超微細構造学的検索を行った。

### (2) CNTsを用いた細胞培養用三次元スキャホールドの開発

MWCNTsをコール酸ナトリウム溶液に分散し、ハニカム構造を有するコラーゲンスポンジを溶液中に浸漬することによりMWCNTsをコーティングし三次元細胞培養用スキャホールドを開発した。各種観察を行うとともに、Soas2を播種し、SEM観察、DNA量およびALP活性を測定した。

### (3) CNTsの表面処理への応用

純チタン板の表面にMWCNTsを鍍金によりコーティングし、SEM観察を行うとともに、Soas2を培養した。

## 4. 研究成果

### (1) CNTsの生体適合性の評価

皮下埋入1週間後では、MWCNTsの周囲に軽微な炎症反応が認められたが、壊死や変性等の強い炎症性変化は観察されなかった。一部のMWCNTsは、マクロファージに貪食されていた。経時的に、MWCNTs周囲の炎症反応は収束したが、埋入後2年を経過しても、異物巨細胞が周囲に観察され、いわゆる肉芽腫性炎を呈していた。MWCNTs周囲の炎症反応は、サイズの大きいものの方が、強い傾向を示した。

透過型電子顕微鏡による観察では、サイズの短いMWCNTsは早期にマクロファージのライソゾーム中に観察されたが、サイズの長いものは、細胞質中に観察された。経時的にMWCNTsの凝集は軽度になる傾向を示したが(図1)、MWCNTs特有のチューブ状の構造には殆ど変化が認められなかったが、1年経過後においては、一部に結晶構造の変化を示唆する像が観察された。

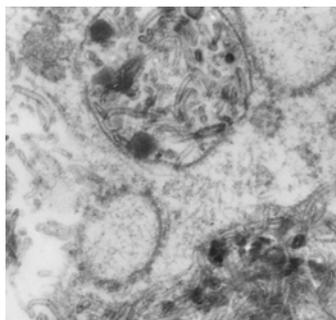


図1

### (2) CNTsを用いた細胞培養用三次元スキャホールドの開発

開発したCNTsコーティング三次元細胞培養用スキャホールドには、SEM観察によりCNTsが一様にコーティングされているのが確認された。(図2)

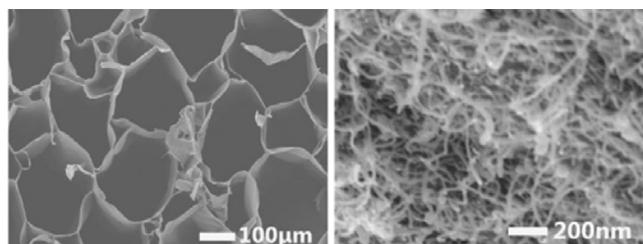


図2

培養3、7日後のスキャホールド中心部における細胞数を図3に示す。ともに、CNTsでコーティングしたスキャホールドのほうが有意に細胞数が多いことが明らかとなった。

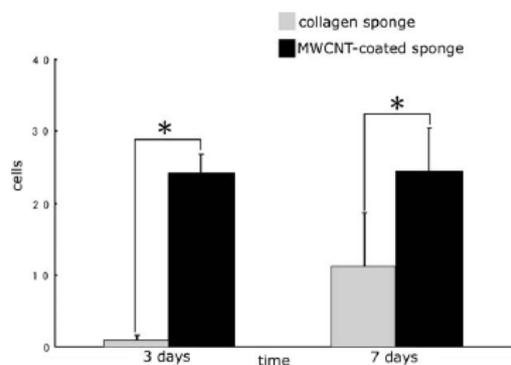


図3

この理由として、細胞播種直後のスキャホールドへの接着が考えられる。図4に示す

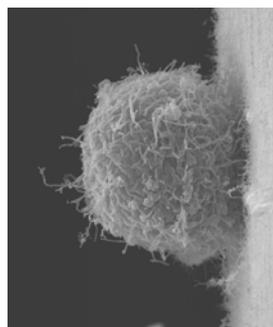


図4

様に、細胞はスキャホールド側壁のMWCNTsにトラップされており、直後から、強固に固着していることが示唆された。

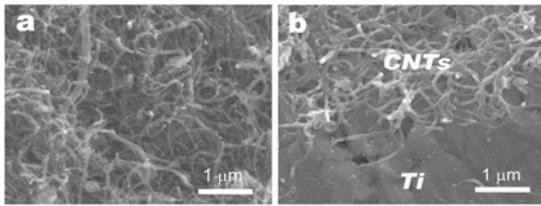


図5

このMWCNTsをコートしたチタン板上においてもSaos2は図6に示すように、伸展していた。

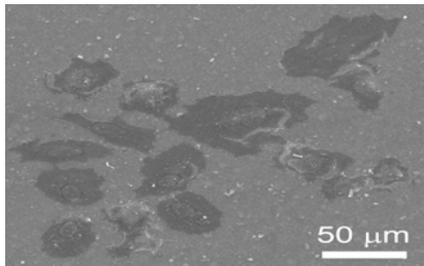


図6

上記の結果から、CNTsの起炎性は低く、CNTsを用いた三次元細胞培養用スキャホールドは細胞培養、特に培養初期の細胞接着と伸展に有利であり、またチタンに表面修飾することも可能であることが明らかとなり、CNTsを用いた顎口腔組織の再建の可能性が示された。今後の展望としては、現在問題となっているCNTsの安全性を長期的に検討するとともに、さらに骨形成能を高めるため、グロースファクターの添加、セラミックス等への表面処理が期待される。

#### 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13件)

1. 3D collagen scaffolds coated with multiwalled carbon nanotubes; Initial cell attachment to internal surface. Hirata E, Uo M, Nodasaka Y, Takita H, Ushijima N, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A *J Biomed Mater Res B*: 93B;544-550,2010. 査読有
2. Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2) to carbon nanotube sheets. Akasaka T, Yokoyama A 他5名②番目, *BMME*, 19;147-153,2009. 査読有  
Carbon Nanotubes Deposited on Titanium Implant for Osteoblast Attachment.
3. Modification of the dentin surface by carbon nanotubes, Akasaka T, Nakata K, Uo M, Watari F, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 19; 179-185,2009. 査読有
4. Material nanosizing effect on living

organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. Watari F, Takashi N, Yokoyama A, 他6名③番目 *Journal of The Royal Society Interface*, 6;S371-386,2009. 査読有

5. Low-voltage and high-voltage TEM observations on MWCNTs of rat in vivo. Sakaguchi N, Yokoyama A, 他3名③番目 *Bio-Medical Materials and Engineering*, 19;93-99,2009. 査読有
6. Development of a 3D collagen scaffold coated with multiwalled carbon nanotubes. Hirata E, Uo M, Yokoyama A, 他3名⑥番目, *J Biomed Mater Res B*: 90B;629-634,2009. 査読有
7. 顎骨再建を目的とした骨補填材開発の現状と展望 横山敦郎 歯界月報 686巻102-107,2008
8. In vivo rat subcutaneous tissue response of binder-free multi-walled carbon nanotube blocks cross-linked by de-fluorination. Sato Y, Yokoyama A, Kasai T, その他8名②番目 *Carbon*, 46;1927-1934,2008. 査読有
9. High-resolution electron microscopy of multi-walled carbon nanotubes in the subcutaneous tissue of rats. Sakaguchi N, Watari F, Yokoyama A, *J Electron Microsc.* 57;159-164,2008. 査読有
10. Preparation and Characteristics of a binderless carbon nanotube monolith and its biocompatibility. Wang, W., Yokoyama A その他6名②番目 *Materials Science & Engineering C*, 28;1082-1086,2008. 査読有
11. Behavior of in vitro, in vivo and internal motion of micro/nano particles of titanium, titanium oxides and others. Watari F, Abe S, Koyama C, Yokoyama A, Akasaka T, 他4名④番目, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 116;1-5. 2008. 査読有
12. Carbon Nanotubes Deposited on Titanium Implant for Osteoblast Attachment. Aoki, N., Yokoyama A, Nodasaka, Y., 他5名②番目 *Journal of Bionanoscience*. 1;14-16,2007 査読有
13. Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials. Wang, W., Watari, F., Yokoyama A, 他6名⑥番目 *J Biomed Mater Res B*. 82B; 223-230,2007. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1. 平田恵理、横山敦郎他 多層カーボンナノチューブをコートした3次元培養単体の開発 バイオマテリアル学会 2009年11月26日 京都テルサ、京都

2. 平田恵理、**横山敦郎**他 多層カーボンナノチューブをコートした3次元培養担体内部への細胞付着機構 第一回ナノバイオメディカル学会2009年7月18日 北海道大学歯学部 札幌
3. 笠井孝夫、**横山敦郎**他 カーボンナノホーンを用いた骨形成-GBR法への応用-第118回日本補綴歯科学会 2009年6月6日 京都国際会議場 京都
4. 平田恵理、**横山敦郎**他 CNTコートした3次元スキャフォールド内部での細胞付着および増殖性 第53回歯科理工学会 2009年4月10日 タワーホール船堀 東京
5. **横山敦郎** カーボンナノ物質に対する組織反応 資源・素材学会 2009年3月28日 千葉工業大学 千葉
6. Hirata E, Uo M, **Akasaka T, Yokoyama A.** 3D scaffold with carbon nanotube coated collagen sponge. 86th General Session & Exhibition of the IADR. July 14, 2008 Toronto Canada
7. 平田 恵理, 宇尾 基弘, **横山 敦郎**, 亘理 文夫カーボンナノチューブコートしたコラーゲンスポンジの3次元培養担体への応用第51回日本歯科理工学会 2008年4月17日 タワーホール船堀 東京
8. Hirata E, **Yokoyama A.** et al. Biocompatibility of Carbon Nanotubes in the subcutaneous tissue. The 33th Fullerene-Nanotubes General Symposium. July 12, 2007 Fukuoka Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, Fukuoka

〔図書〕(計0 件)

〔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 なし

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・助教  
 研究者番号：00360917

佐藤義倫 (YOSHINORI SATO)  
 東北大学・大学院環境科学研究科・助教  
 研究者番号：30374995

山本 悟 (SATORU YAMAMOTO)  
 北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：10344524

安田元昭 (MOTOAKI YASUDA)  
 北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
 研究者番号：90239765

東野史裕 (FUMIHIRO HIGASHINO)  
 北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
 研究者番号：50301891

進藤正信 (MASANOBU SHINDO)  
 北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
 研究者番号：20162802

(3) 連携研究者 なし  
 ( )

研究者番号：