

学位論文題名

多層カーボンナノチューブによる生体材料の表面改質

学位論文内容の要旨

～多層カーボンナノチューブを用いた細胞培養担体の開発～

〔緒言〕カーボンナノチューブ(CNTs)は、化学的安定性、機械的強度、電気特性だけでなく生物学的、医学的特徴などにも優れていることから多方面での応用に期待されている。最近では生物学的、医学的分野での研究報告が多くみられ、特にCNTsには細胞親和性があるとの報告から、CNTsを用いた細胞培養担体の研究も多い。他方、コラーゲンコートされた細胞培養用ディッシュは高い細胞付着性を持つことから広く使用されている。そこで我々は、コラーゲンコートされたディッシュに細胞親和性のあるCNTsをコートさせ、新たな細胞培養担体を開発することを目的とし研究を行った。

〔材料および実験方法〕精製した多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)を分散性を高めるため、カルボキシル化し、コール酸ナトリウム水溶液(0.1-1.0w/v%)にMWCNTsが1-1000ppmとなるよう均一に分散させ、MWCNTs分散液とした。これをcollagen-coated dishに注ぎ、数時間静置後、洗浄、室温乾燥させ、MWCNT-coated dishを作製した。得られたMWCNT-coated dish表面をSEMにて観察した。MWCNT-coated dishにマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を 1×10^5 cells/35mm dishとなるよう播種し、通法にて1-3日間培養し、経時的にGiemsa染色での光学顕微鏡観察、SEM観察、Alamer BlueTMによる細胞活性評価、細胞増殖率の算出を行った。細胞付着性に関しては、0.02%、1%trypsin-EDTAを細胞培養中のdishに作用させ、dish上の残存細胞数から評価した。

〔結果および考察〕MWCNTs分散液濃度、作用時間が増せばcollagen上のMWCNTsも増すが、凝集体が生じた。100ppm分散液を3時間作用させるとcollagenにMWCNTsを均一に凝集体なく付着させることができた。また、MWCNT-coated dishは高い透過性を持ち、従来のCNTsを用いた多くの細胞培養担体で困難であった光学顕微鏡細胞観察が可能であった。

MWCNT-coated dishの細胞活性、細胞増殖率はcollagen-coated dishと比べやや低いものの、collagenの高い細胞親和性を考慮するとほぼ同等と考えられた。細胞付着性試験では、trypsin-EDTA濃度に関係なくcollagen-coated dish上の細胞が数分で全て剥離したのに対し、MWCNT-coated dish上の細胞は30分の処理でもdish上に残存し、高い細胞付着性を示した。この細胞付着能は、MWCNTsと細胞との機械的結合、MWCNTsのカルボキシル化、比表面積の増大、細胞接着因子の増大によると考えられた。

～多層カーボンナノチューブのチタンへの付着応用～

〔緒言〕 歯科用インプラントの研究の中でも歯根膜付着型のインプラントの研究は非常に興味深く、歯槽骨への咬合圧緩衝、咬合圧センサーなどの特性を持つことが考えられる。実際、インプラント表面改質による歯根膜付着の報告がある。他方、CNTs には生体親和性、高い細胞付着能があることが過去の研究でも確認されている。このことから、MWCNT-coated dish の作製方法を歯科用インプラントで頻用されているチタンに応用し、チタン表面に強固に細胞付着させる研究を行った。

〔材料および実験方法〕 鏡面研磨した 16×5×1mm のチタン板(polished Ti plate)を 80℃下で 10w/v%の 3-aminopropyltriethoxysilane を 12 時間作用させてアミノ化した。0.1%アテロコラーゲン水溶液中に 4℃下で 3 時間浸漬し洗浄、室温乾燥させた(collagen-coated Ti plate)。次に、100ppmMWCNTs 分散液を collagen-coated Ti plate に 3 時間室温で作用させ、洗浄、室温乾燥させ MWCNT-coated Ti plate を作製した。3 種のチタン板の表面を SEM 観察し、表面粗さを測定した。また、MWCNT-coated Ti plate のチタン板の代わりに cover glass (MWCNT-coated cover glass) を用いて collagen と MWCNTs の付着状態を SEM にて観察した。さらに各チタン板に MC3T3-E1 を 8×10^3 cells/plate で播種し、通法にて培養後、MWCNT-coated dish と同様に経時的に SEM での細胞観察、細胞増殖率の算出を行い、0.02%trypsin-EDTA を用いて細胞付着性を評価した。

〔結果および考察〕 MWCNT-coated Ti plate 上には凝集体なく MWCNTs が均一に付着しており、洗浄などの操作で脱落することなく強固に付着していた。表面粗さは MWCNT-coated Ti plate が最も粗く、数十 nm スケールからサブミクロンスケールの凹凸が確認された。断面観察では、150-300 μ m の厚みで collagen が付着し、その上に薄く一層の MWCNTs が付着していた。MWCNT-coated Ti plate 上の E1 細胞の増殖率は、他の 2 種類のチタン板よりやや低いが、経時的に増殖していた。但し、対照としたチタンや collagen は極めて細胞親和性が高いため、MWCNTs コートによる細胞親和性も良好なものと考えられた。また細胞付着性試験では、collagen-coated Ti plate 上の細胞が trypsin 処理 10 分後には全て剥離したのに対し、MWCNT-coated Ti plate 上では約 9%の残存細胞が認められた。このことから、MWCNT-coated Ti plate の非常に高い細胞付着性が確認された。この細胞付着性の要因は MWCNT-coated dish と同じであると考えられた。

〔まとめ〕 適切に処理した MWCNTs 分散液を用いることにより、MWCNTs を均一に凝集体なく付着させた MWCNT-coated dish および Ti plate を作製することが可能であった。両者のコート物は洗浄、培養処置、トリプシン処置で剥離することはなく安定し、高い細胞親和性を示したことから、細胞培養に応用することが可能であると考えられた。MWCNT-coated dish は、高い細胞付着能を有していることから、通常の培養担体には付着、培養しにくい細胞も付着させる可能性が推測された。一般に CNTs から成る細胞培養担体は光学的に不透明であるが、本 MWCNT-coated dish は、光学顕微鏡観察が可能な新たな細胞培養用担体となりえる可能性が示唆された。MWCNT-coated Ti plate は、インプラント表面に応用することにより、表面に高い細胞付着性を付与し、インプラント周囲組織と強固に接着することができると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 亘 理 文 夫
副 査 教 授 横 山 敦 郎

学 位 論 文 題 名

多層カーボンナノチューブによる生体材料の表面改質

審査は、審査担当者全員出席の元、申請者の研究要旨の説明後、本研究、提出論文とそれに関連した事項について口頭試問の形式にて行った。審査論文の概要は以下の通りである。

カーボンナノチューブ(CNTs)は、化学的安定性、機械的強度、電気的特性に優れ、高い生体適合性も推測されており、多方面での応用が期待されている。そこで我々はCNTsをcollagen-coated dish表面にコートさせ、新たな細胞培養担体を開発し、その培養特性を評価した。さらに同dishの作製技術を歯科用インプラントで主に用いられるチタンに応用し、チタンへの細胞付着性を向上させることを目的とした。

精製多層CNTs(MWCNTs)に水酸基を付与し、100ppmとなるようコール酸ナトリウム水溶液に均一に分散後、collagen-coated dishに3時間作用させ、MWCNTsを凝集体なく均一にコートさせたMWCNT-coated dishを得た。得られたdishは、高い透光性を持ち、従来のCNTsを用いた担体では困難であった光学顕微鏡観察が可能となった。また、良好な細胞増殖、細胞活性を認め、通常では細胞が剥離するtrypsin-EDTAを用いた細胞付着性試験ではMWCNT-coated dish上の細胞が多く残存していた。

また、鏡面研磨チタン板をアミノ化し、アテロコラーゲンを付着させ、MWCNT-coated dishの作製法と同条件でMWCNTs分散液を作用させたところ、MWCNTsは凝集体なく均一にコートされた(MWCNT-coated Ti plate)。MWCNTsはコラーゲンを介しチタン表面に強くコートされ、通常の培養操作では剥離しなかった。また、このコーティング層の厚みは150-300nmで、MWCNT-coated Ti plateの表面粗さはMWCNTsにより有意に増加した。MWCNT-coated Ti plateにもdish同様、良好な細胞増殖と高い細胞付着性が認められた。このMWCNT-coated dishとTi plateの付着性は、細胞とMWCNTsの機械的結合だけでなく、MWCNTsによる比表面積の増大やMWCNTsのカルボキシ

ル化が細胞接着因子をより多く MWCNTs に吸着させたことに因ると推測された。

以上のことから、MWCNT-coated dish の新たな細胞培養用担体としての可能性や、MWCNT-coated Ti plate の特性から、細胞接着能を有した表面を持つチタン製インプラントの開発に応用できる可能性が示唆された。

論文の審査にあたり、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。

主な質問事項は、

- 1) MWCNTs の作製法、
- 2) MWCNTs とコラーゲンの結合様式、
- 3) MWCNTs 分散液作製に用いたコール酸ナトリウム水溶液の為害性、
- 4) MWCNT-coated dish および Ti plate 上での E1 細胞の活性、増殖について、
- 5) MWCNT-coated dish および Ti plate の細胞付着能について

等であった。

いずれの質問についても、申請者から適切かつ明快な回答、説明がなされた。また将来の研究の方向性についても示された。このことから、申請者には、研究に対する立案、遂行、結果の収集とその分析と評価を十分に行う能力が備わっていると考えられた。当該研究は、CNTs を生化学培養機器や外科・歯科用インプラント材料にコーティングする方法を独自に開発し、それらが優れた細胞付着性・生体適合性を示すことを見出した。研究内容は、特に注目を集めているナノ材料に関する先進的研究であり、オリジナリティーにも富むことから、その内容は高く評価された。また、申請者は、関連分野にも幅広い学識を有し、新たな研究を常に模索する熱意を持ち、研究に邁進し、関連分野に大きく貢献することが示唆され、将来性にも高い評価が認められた。以上のことから、申請者は、博士(歯学)の学位に値するものと認められた。