

学位論文題名

Investigation of the influence of carbon nanotubes on
cell culture and applications for
reconstruction materials for soft tissue

(カーボンナノチューブの細胞培養への影響評価と軟組織再建材料への応用)

学位論文内容の要旨

悪性腫瘍の手術では広範囲の組織切除を伴うことも多く、特に口腔癌などでは、術後、会話や摂食・嚥下にかかわる機能に大きな障害を残す。現在それらの欠損部に対しては、主に金属プレートによる再建や自家組織移植が行われているが、舌などの軟組織に対しての人工再建材料は実用化されていない。現在使用されているシリコーンゴムは柔軟性に富むが組織接着性に劣り、埋入後、周囲組織との間に被膜を形成するなどの問題がある。

カーボンナノチューブ(CNT)は六員環の炭素のみからなるグラフェンシートが細いチューブ状からなる構造を有し、その機械的・化学的特性から様々な分野での研究がすすめられている素材であり、バイオ分野での応用も期待されている。本研究では、CNTのユニークな特性に着目し、これをシリコーンの表面コート剤として応用することで細胞接着性を向上させ、シリコーンの持つ問題点を解決できるのではないかと考えた。本研究では、CNTが培養細胞へ及ぼす影響の評価と、その特性を利用した軟組織再建材料への応用について検討した。

CNTの形態の違いによる影響を比較するため、細く柔軟な単層CNT($\phi 0.8-2.5\text{nm}$ 、Meijo Nano Carbon社)と太く湾曲した多層CNT($\phi 20-40\text{nm}$ 、NanoLab社)の二種類を使用した。

CNTが培養細胞(Saos-2)に及ぼす影響

まず、CNTそのものが細胞に及ぼす影響を、ヒト骨芽細胞様細胞(Saos-2)を用いて検討した。カルチャーディッシュの表面に単層および多層CNTをコートした細胞培養用ディッシュを作製し、Saos-2を培養した。培養3日後の細胞活性(Viability)は、通常のカルチャーディッシュと比べCNTコートディッシュの方が高く、特に多層CNT上で有意に細胞活性が高かった。各ディッシュ上でのAlkaline phosphatase(ALP)活性は3日目、6日目共にほぼ同等であった。また、各ディッシュ上で3日間培養した細胞の走査型電子顕微鏡(SEM)による観察では、多層CNT上で培養した細胞で良好な仮足の伸展が観察された。このように、多層CNT上での良好な細胞

接着が示唆されたため、続いて細胞接着に関する実験を行った。

各ディッシュ上で3日間培養した細胞に、5-30分の0.1%トリプシン処理を行い、ディッシュ上に残存した細胞数から細胞残存率を算出し、これを比較した。カルチャーディッシュおよび単層CNTディッシュでは10分以内の処理でほとんどの細胞が剥離してしまったのに対し、多層CNTディッシュでは30分以上処理しても20%程の細胞が残存していた。また、Vinculinの染色により接着斑の分布を観察したところ、スライドガラスと単層CNTをコートしたガラス上では接着斑が細胞周囲にのみ分布していたのに対して、多層CNT上では細胞底面全体に接着斑の分布が認められた。これは、多層CNTの太く湾曲した構造が細胞の仮足の伸展を促すことにより、細胞底面での接着斑の増加とそれによる細胞接着力の向上につながったものと考えられた。

これらの結果より、CNTが細胞の活性や機能を低下させることなく、細胞接着力を向上させることが明らかとなった。そこで、シリコン表面の細胞接着性の向上を目的とし、次の実験を行った。

CNTをコートしたシリコンシート上での骨芽細胞(Saos-2)の増殖

シート状のシリコン表面にエタノール中に分散させた単層および多層CNTを塗布し乾燥させるという方法でCNTのコーティングを行った。それぞれ表面CNT量が低密度($1\mu\text{g}/\text{cm}^2$)および高密度($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$)の2種類を作製した。SEMにより、CNT高密度にコートしたものではシート全体がCNTで覆われているのが観察された。表面粗さ(R_a)は、単層、多層共に粗さの増加が認められた。蛍光アルブミンを用いたタンパク吸着試験では、何もコートしていないシリコンと比べ、CNTをコートしたもの、特に多層CNTをコートしたものでアルブミンの吸着量が増加していた。

続いて、細胞親和性を評価するためそれぞれのシート上へSaos-2を播種し、6日間培養を行った。その結果何もコートしていないシリコン上では、ほとんど細胞が増殖していなかったのに対し、CNTコートにより多数の細胞が増殖する事が明らかになった。コート量による比較では、単層CNTをコートしたシリコン上では低密度でも細胞の増殖が認められたのに対し、多層CNTでは低密度では細胞の増殖が認められなかった。これは、SEMによる観察により多層CNTでは多数の凝集塊が認められたことから、シリコン表面でのCNTの分散性が異なり、低密度では表面全体が均一にコートできていなかったことによるものと考えられた。しかし、多層CNTでも高密度では細胞の良好な増殖を認めたことから、単層、多層いずれにおいても細胞の接着性を向上させることができるということが明らかになった。これはCNTのコーティングにより表面に網目状のナノ構造が形成されたことと、CNTに対するタンパクの吸着により、細胞が接着しやすい表面環境を形成したことによると考えられる。

しかしながら、シリコンの表面にCNTを分散させるというコート法では、生体内に適用する場合CNTが剥離してしまうという問題点が残る。さらに、異なる細胞種でも同様の結果が得られ

るかも検討する必要がある。そこで、次の実験では、シリコンのコート法の改善及び筋芽細胞 (C2C12) での評価を行った。

シリコンのコート法の改善、及び筋芽細胞 (C2C12) での増殖評価

シリコンのコートは、単層および多層 CNT を用いたシート状の CNT を作製し ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、その上にシリコン流し込み重合・硬化させるという方法で行った。この方法を用いることで CNT が物理的にシリコン表面に固着し、より安定的なコーティングを行うことが可能になった。原子間力顕微鏡 (AFM) による観察で、CNT がシリコン表面で網目状構造を形成していることが確認された。また、テープテストでも表面 CNT の明らかな剥離は認められず、コーティングが概ね安定していることが確認された。本方法でコートしたシリコン上での細胞親和性を評価するため、マウス筋芽細胞 (C2C12) を、何もコートしていないシリコン、単層および多層 CNT をコートしたシリコンに播種し、播種 1、6 時間後 (初期付着) と 3 日後 (細胞増殖) の細胞数の計測、SEM による観察を行った。その結果、何もコートしていないシリコンでは、6 時間後でもほとんど細胞が付着していなかったのに対し、CNT をコートしたものでは良好な細胞付着を認めた。単層と多層の比較では、多層 CNT 上の方が細胞の付着が良好であった。培養 3 日目の結果もほぼ同様で、何もコートしていないシリコンでは、ほとんど細胞が増殖していなかったのに対し、CNT コートしたシリコン、特に多層 CNT 上で非常に良好な細胞増殖を認めた。SEM での観察でも同様の結果を示しており、多層 CNT をコートしたシリコン上で C2C12 がシート全体を覆っているのが観察された。

以上の研究より、CNT 上で細胞を直接培養しても細胞の活性や機能を低下させることはなく、さらに CNT をコートすることにより細胞非接着性のシリコン表面に接着性を付与でき、特に多層 CNT をコートした表面に対して細胞が強固な接着性を示すことが明らかになった。これらの結果は、CNT を表面コートしたシリコンが柔軟性を要求される舌などの軟組織の再建材料として高い可能性を有することを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 亘 理 文 夫

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Investigation of the influence of carbon nanotubes on cell culture and applications for reconstruction materials for soft tissue

(カーボンナノチューブの細胞培養への影響評価と軟組織再建材料への応用)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下の通りである。

本研究は、カーボンナノチューブ (CNT) のユニークな特性に着目し、これをシリコン表面にコートした CNT コーティング・シリコンの、軟組織再建材料としての可能性について検討したものである。CNT の形態の違いによる影響を比較するため、実験には、直径 1nm 程度で通常バンドル化し直径 20–30nm 程度になっている単層 CNT と、直径 30nm 程度の屈曲性に富む多層 CNT の二種類を使用した。

最初に、ヒト骨芽細胞様細胞 (Saos-2) を用いて CNT が細胞に及ぼす影響を検討した。通常のカルチャーディッシュと比べて、CNT コートディッシュでは細胞活性が高く、特に多層 CNT で有意に高いことを示した。走査型電子顕微鏡観察では、多層 CNT 上で培養した細胞で良好な仮足の伸展が認められた。Alkaline phosphatase 活性には差はなかった。

次に、培養細胞のトリプシン処理により、細胞接着力を検討した。カルチャーディッシュや単層 CNT ディッシュに比べて、多層 CNT ディッシュでは細胞接着力が強く、また Vinculin 染色で細胞底面全体に接着斑が認められることを示し、CNT は細胞の活性や機能を低下させることなく、細胞接着力を向上させることを明らかにした。細胞接着力の向上については、多層 CNT の屈曲性に富む構造が細胞の仮足の伸展を促し、それにより細胞底面での接着斑が増加したためと推測している。

次いで、CNT のシリコンへの応用を検討した。シート状のシリコン表面にエタノール中に分散させた単層および多層 CNT を繰り返し塗布・乾燥させて作製した CNT コーティング・シリコンを用いて Saos-2 の培養を行い、一般に CNT コートにより細胞が増殖することを示した。この理由として、CNT のコーティングにより表面に網目状のナノ構造が形

成されたこと、ならびに CNT に対するタンパクの吸着により、細胞が接着しやすい表面環境が形成されたことをあげている。

さらに、コーティングされた CNT がシリコンから剥離するのを防ぐため、まずシート状の CNT を作製し、その上にシリコン流し込み重合・硬化させることにより、新たな CNT コーティング・シリコンを作製した。この材料は、CNT がシリコン表面で網目状構造を形成しており、テープテストでも表面 CNT の剥離はほとんど認められなかった。この CNT コーティング・シリコン上でマウス筋芽細胞 (C2C12) の培養実験を行い、CNT コーティング・シリコン、特に多層 CNT の上で良好な細胞増殖が認められることを示した。

本研究により、CNT 上で細胞を培養しても細胞の活性や機能は低下しないこと、CNT、特に多層 CNT、をコートすることによりシリコン表面に細胞接着性が付与され、細胞の増殖が可能となることが明らかになった。これらの結果は、CNT コーティング・シリコンが柔軟性を要求される舌などの軟組織の再建材料として高い可能性を有することを示している。

論文の審査にあたって、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質問が行われた。

主な質問事項は、以下の通りである。

- 1) シリコンへのコーティングの試みは以前にも行われているのか、
- 2) CNT の純度とは何を意味しているのか、
- 3) Cell viability の計測はどのように行ったのか、
- 4) 接着斑・vinculin とはどのようなものか、
- 5) 金属でない CNT で電気が流れるのは何故か、
- 6) 線維芽細胞でも同じように増殖するのか、
- 7) CNT の優れた性質は何か、

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的な回答が得られた。本研究は、柔軟ではあるが細胞接着性を欠くシリコンに、CNT をコーティングすることにより細胞接着性を付与し、軟組織再建材料としての可能性を広げたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認められた。