



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Multiwalled carbon nanotubes coating accelerates osteoconductivity of anodized titanium [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	井上, 沙織
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11243号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56119
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Saori_Inoue_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 井 上 沙 織

学 位 論 文 題 名

Multiwalled carbon nanotubes coating accelerates osteoconductivity of anodized titanium

（多層カーボンナノチューブによる表面修飾は陽極酸化チタンの骨伝導性を促進する）

【緒言】

カーボンナノチューブ (CNTs) は炭素六員環がチューブ状に結合したものである。機械的特性や化学的安定性に優れ、良好な細胞増殖や強固な細胞接着を示すことから生体材料への応用が期待されている。我々はこれまでの *in vivo* および *in vitro* の研究を行い、タンパク吸着性、細胞親和性、さらには骨適合性等などの生物学的に優れた特徴を持つことを報告してきた。一方、近年臨床応用されている歯科用インプラントには、優れた機械的特性や生体適合性からチタンが用いられ、インプラントの成功の必須条件である *osseointegration* の早期獲得のために様々な表面改質についての研究が行われている。本研究では、CNTs の良好な生体適合性と骨適合性に着目し、陽極酸化チタンに CNTs コーティングを行い、その細胞培養特性と骨伝導性を評価することを目的とした。

【材料と方法】

1. CNT コーティング陽極酸化チタンの作製

チタン(Nilaco 社: 純度 99.5%)(以下 Ti)を耐水研磨紙で研磨したのち、 α -グリセロリン酸(>85%, 東京化成工業)・酢酸カルシウム(99%, 関東化学)水溶液中にて 320V 高電圧下で陽極酸化を行い、得られたものを陽極酸化 Ti とした(Ano-Ti)。次に無水トルエンを溶媒とした 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES:東京化学工業)溶液中に Ano-Ti を浸漬し、8 時間 80°C 下で真空加熱乾燥を行い、反応させた。得られたものをシランカップリング陽極酸化 Ti とした(Sc-Ti)。さらに、親水化处理された多層カーボンナノチューブ(Nanolab 社: 直径 15-45nm, 長さ 1-5mm)を脱イオン化蒸留水に分散させ、100ppm CNTs 分散水溶液を作製し、この水溶液中に ethyl diazoacetate (EDA)を触媒として Sc-Ti を浸漬後、洗浄し真空加熱乾燥(80°C, 8h)

を施し、CNT コート陽極酸化 Ti (CNT-Ti)を作製した。

2. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

走査型電子顕微鏡(S4000, Hitachi, Japan,10kV)を用い、Ano-Ti, Sc-Ti, CNT-Ti の表面性状を観察した。

3. 細胞培養実験

CNT-Ti プレート上にヒト骨芽細胞様細胞(Saos2)を播種し、3 および 7 日間培養を行った。Ano-Ti, Sc-Ti についても同様に培養を行った。培養後、SEM 観察を行うとともに DNA 量と ALP 活性の測定を行った。

4. 動物実験

生後 10 週齢 Wistar 系雄性ラット(24 匹,体重 330-340g)左側大腿骨に、直径 1mm の歯科用バーにて穴をあけた後、Ano-Ti および CNT-Ti ワイヤーをインプラント体として、骨髓腔内に骨の長軸方向に平行に埋入した。

2 および 4 週間経過後、インプラント体を周囲組織とともに摘出し、固定後、EDTA にて脱灰し、インプラント体を丁寧に撤去した。通法に従い、パラフィン標本を作製し、HE 染色を行い、光学顕微鏡(AX-80, OLYMPUS)による組織学的観察を行った。また、組織計量学的検索としてインプラント体と骨との接触率を測定した。

さらに、インプラントと骨との界面を詳細に観察するため、埋入後 4 週後にワイヤーを周囲組織とともに取り出し、非脱灰にて樹脂包埋を行った。厚さ 1mm に試料を加工後、試料を集束イオンビーム(FIB: JIB-4601F, JEOL)にてインプラント縦方向に切削・加工した後、エネルギー分散形 X 線分光器(EDS: JED-2300, JEOL)による元素分析を行った。

【結果】

1. SEM 観察

CNTs は、陽極酸化チタン上に緊密にコートされていた。Ano-Ti と Sr-Ti の間には表面構造に差異は認められなかった。

2. 細胞培養実験

SEM 観察の結果から、CNT コート陽極酸化 Ti 上で Saos2 細胞が良好に接触、進展し、増殖している様子が観察された。CNT-Ti においては、細胞の仮足と CNTs との間に密な接触が観察された。培養後の CNT-Ti における Saos2 の DNA 量は、Ano-Ti および Sc-Ti と比較し、有意に高い値を示した。ALP 活性においては、3 つの群間に差は認められなかった。

3. 動物実験

インプラント体埋入 2 週後において、新生骨は Ano-Ti, CNT-Ti のいずれにおいても試料表面に直接接して形成されていたが、CNT-Ti においてより多くの新生骨が観察された。

4 週においては CNT-Ti ではインプラント体のほぼ全周に新生骨が観察された。CNTs-Ti の一部表面には、CNTs と考えられる黒色の点状の構造が観察された。CNT-Ti の骨接触率は、2 および 4 週ともに、Ano-Ti に比較し有意に高い値を示した。元素分析の結果、陽極酸化チタンの特徴であるマイクロポアの部分にカルシウムとリンが認められ、骨が形成されてい

ることが確認された。CNT-Ti において CNTs を示唆する炭素の層が CNT-Ti と骨界面に認められたが、Ano-Ti と骨の間には炭素の層は認められなかった。炭素層の厚みは 2 μ m 程度であった。

【考察】

シランカップリングを用いることにより、簡便かつ緊密に陽極酸化チタンに CNTs をコーティングすることが可能であった。シランカップリング処理は、すでに歯科臨床や、細胞培養のカルチャーディッシュにも用いられている生体安全性の高い処理方法であり、シランカップリングのアミド基と CNTs に修飾されたカルボキシル基による共有結合が CNTs とシラン処理を行った陽極酸化チタンの結合に関与していることが推測された。CNT-Ti に超音波処理を行った後も SEM 観察にて CNTs の残留が認められ、さらにラット大腿骨に CNT-Ti を埋入後 4 週間経過した後も、CNTs と考えられる炭素の残存を認めたことから、CNTs とシラン処理チタンの結合は強固であり、生体内においても安定であることが推察された。

骨芽細胞様細胞である Saos2 を用いた細胞培養において、CNT-Ti の DNA 量は、Ano-Ti や Sr-Ti に比較し有意に高い値を示した。この結果は、CNTs によるチタン表面コーティングは骨芽細胞様細胞の増殖に有効であることを示している。一方、単位 DNA 量あたりの ALP 活性には、本研究では有意差は認められなかった。これまでの研究で、CNTs は骨芽細胞の分化に影響を与えることが報告されており、今後、プライマリーな骨芽細胞や未分化な間葉系細胞を用い、分化への影響について研究を行う必要がある。

ラットを用いた動物実験の結果、CNT-Ti では Ano-Ti に比較して有意に高い骨接触率を示したことから、初期の骨形成に有利であることが示された。この理由として CNT-Ti が有するマイクロ-ナノ構造が考察される。すなわち陽極酸化処理により形成されたチタン表面のマイクロポアに代表されるマイクロ構造に CNTs のナノ構造がコーティングされることにより、マイクロ-ナノ複合構造が形成され、骨形成に有利に作用したと考えられる。マイクロ-ナノ構造は、材料表面積を増加し、ぬれ、タンパク吸着を増加することにより骨形成に有効であるとの報告もなされている。加えて CNTs 特有の構造は、細胞の接着に有利であることから、これらが相まって骨形成を促進したものと推察された。

【結論】

陽極酸化チタンに対するカーボンナノチューブ表面修飾は細胞適合性および骨伝導性向上することが明らかとなった。