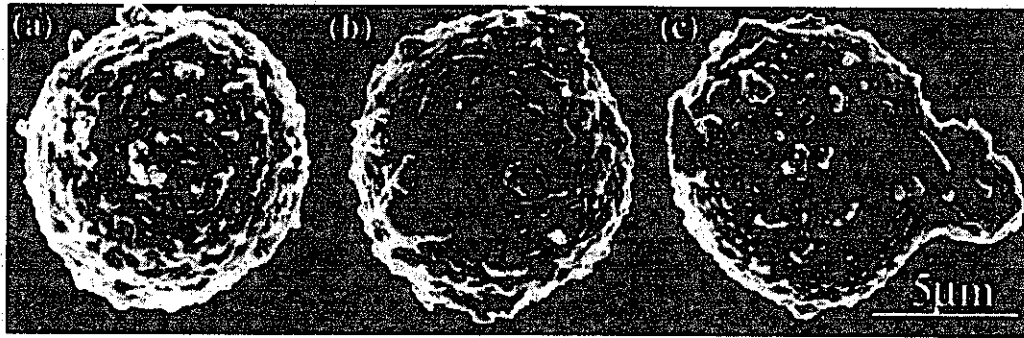
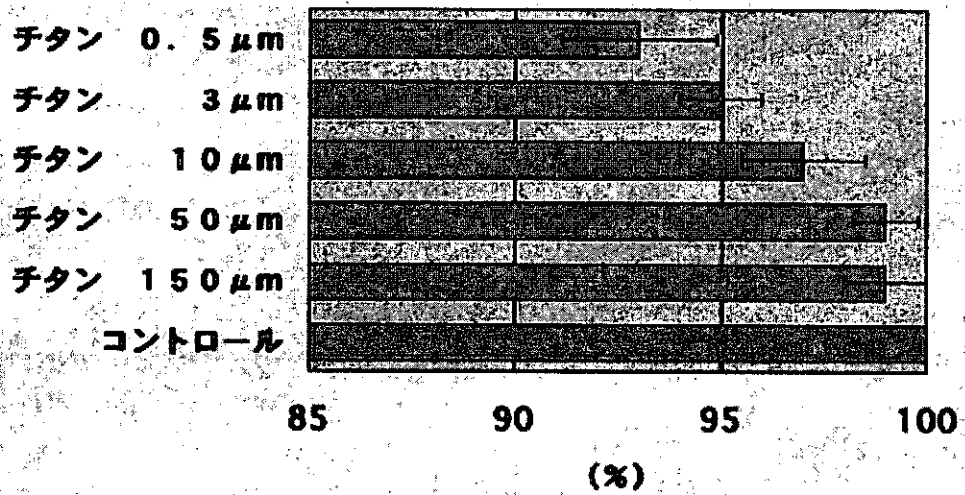


好中球によるチタン微粒子の貪食



細胞生存率



炎症性サイトカイン IL-1β の放出

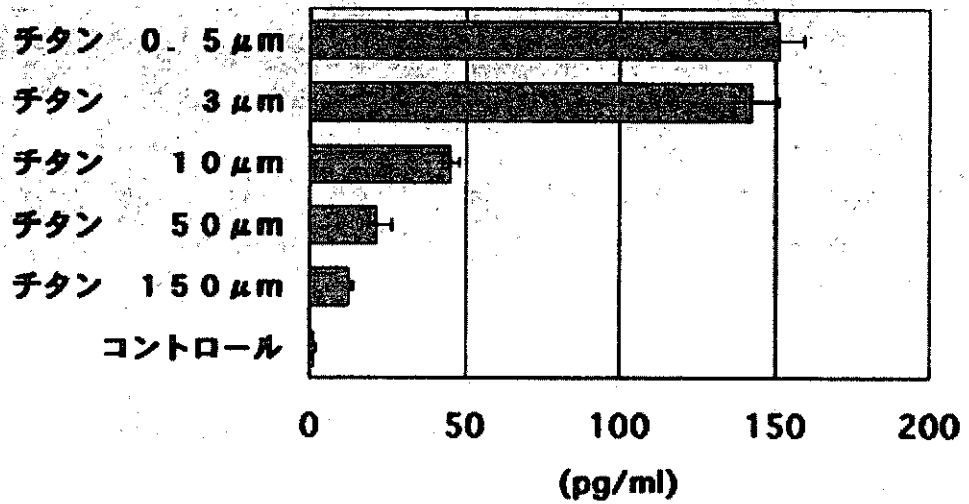


図1 ヒト好中球(a)、チタン微粒子混在時(b)、貪食時(c)のSEM像(上段)ならびに細胞生存率(中段)、IL-1β放出のチタン微粒子サイズ依存性(下段)

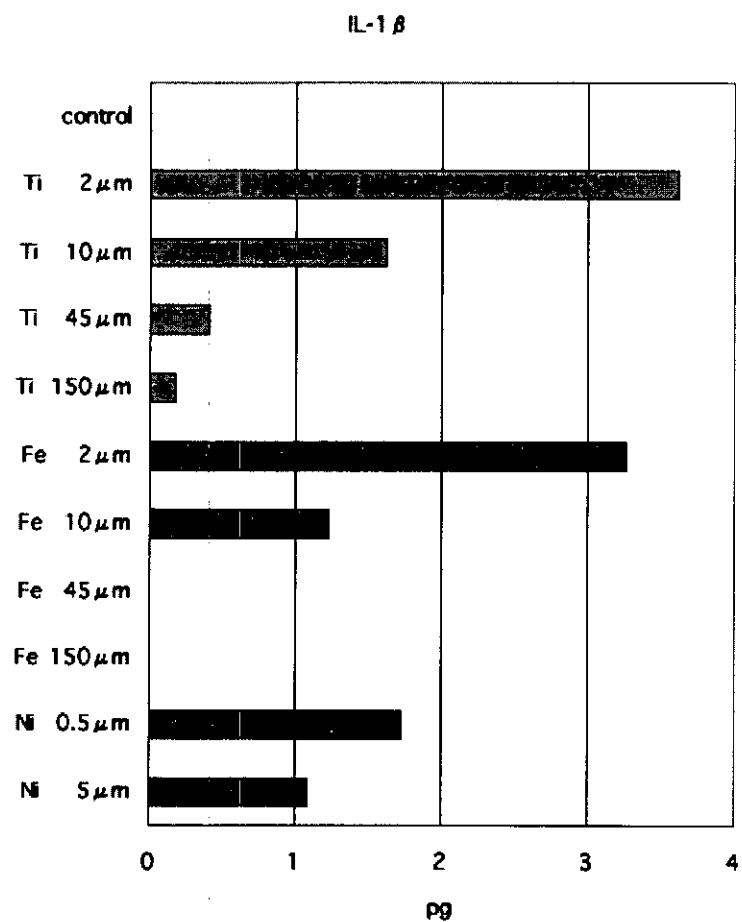


図2 ヒト好中球からのIL-1 β 放出のTi, Fe, Ni微粒子サイズ依存性

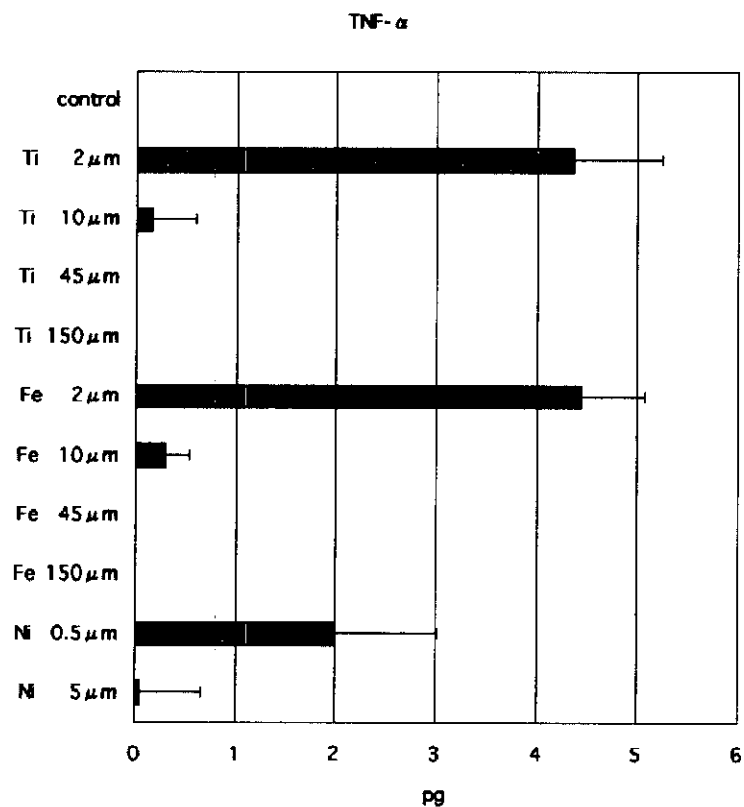


図3 ヒト好中球からのTNF- α 放出のTi, Fe, Ni微粒子サイズ依存性

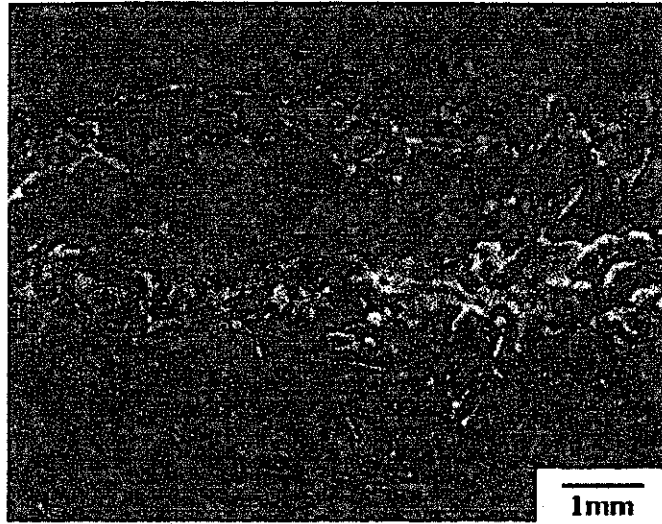


図4 チタン表面に形成された窒化チタン層の断面SEM像

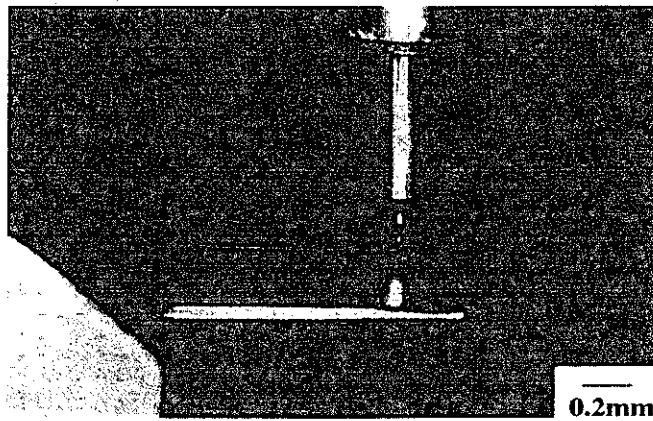


図5 マルテンス引っかき硬さ試験

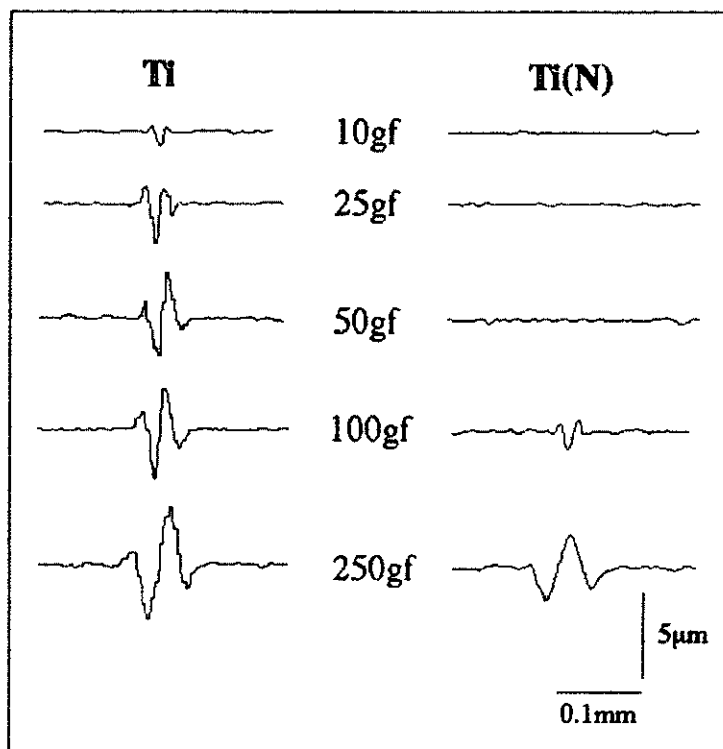


図6 マルテンス引っかき硬さ試験後の断面プロファイル。Ti：チタン、Ti(N)：表面窒化チタン。

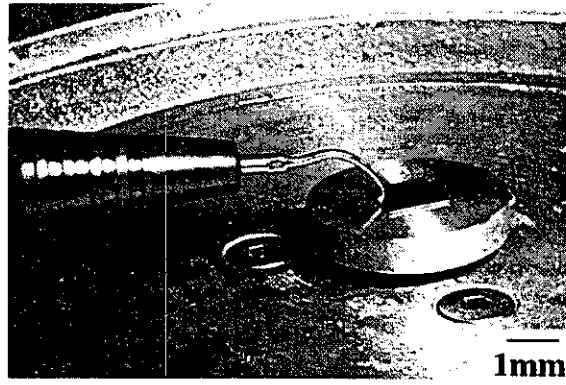


図7 歯科用超音波スケーラー摩耗試験

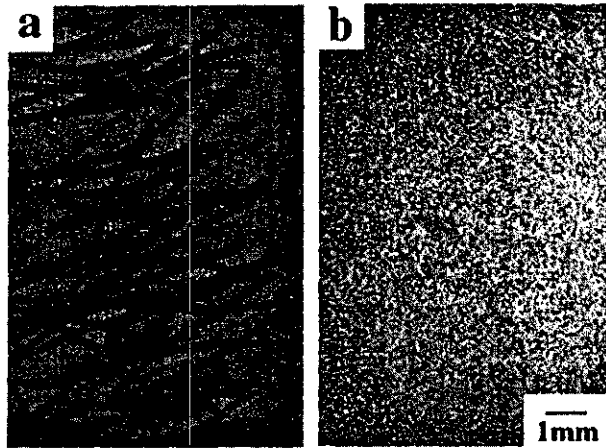


図8 超音波スケーラー操作後の表面(a : チタン、b : 表面窒化チタン)。窒化チタンでは全く研磨傷が認められない。

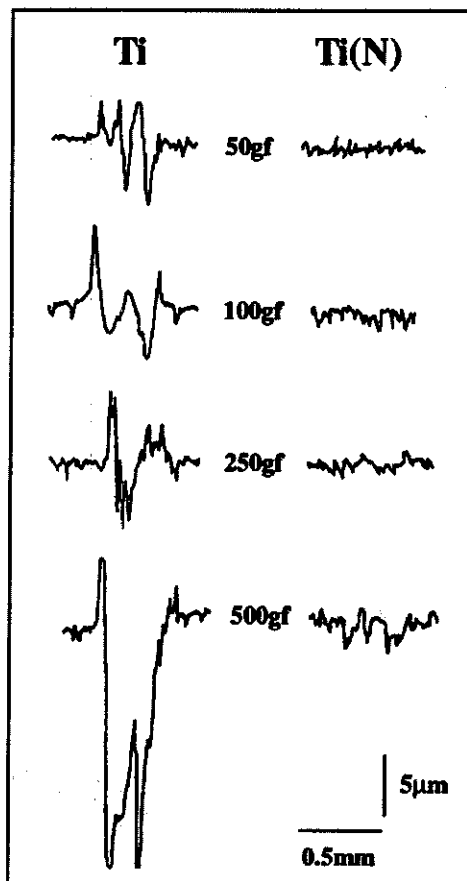


図9 超音波スケーラー摩耗試験後の断面プロファイル。Ti : チタン、Ti(N) : 表面窒化チタン。窒化チタンは耐摩耗性がきわめてすぐれている。

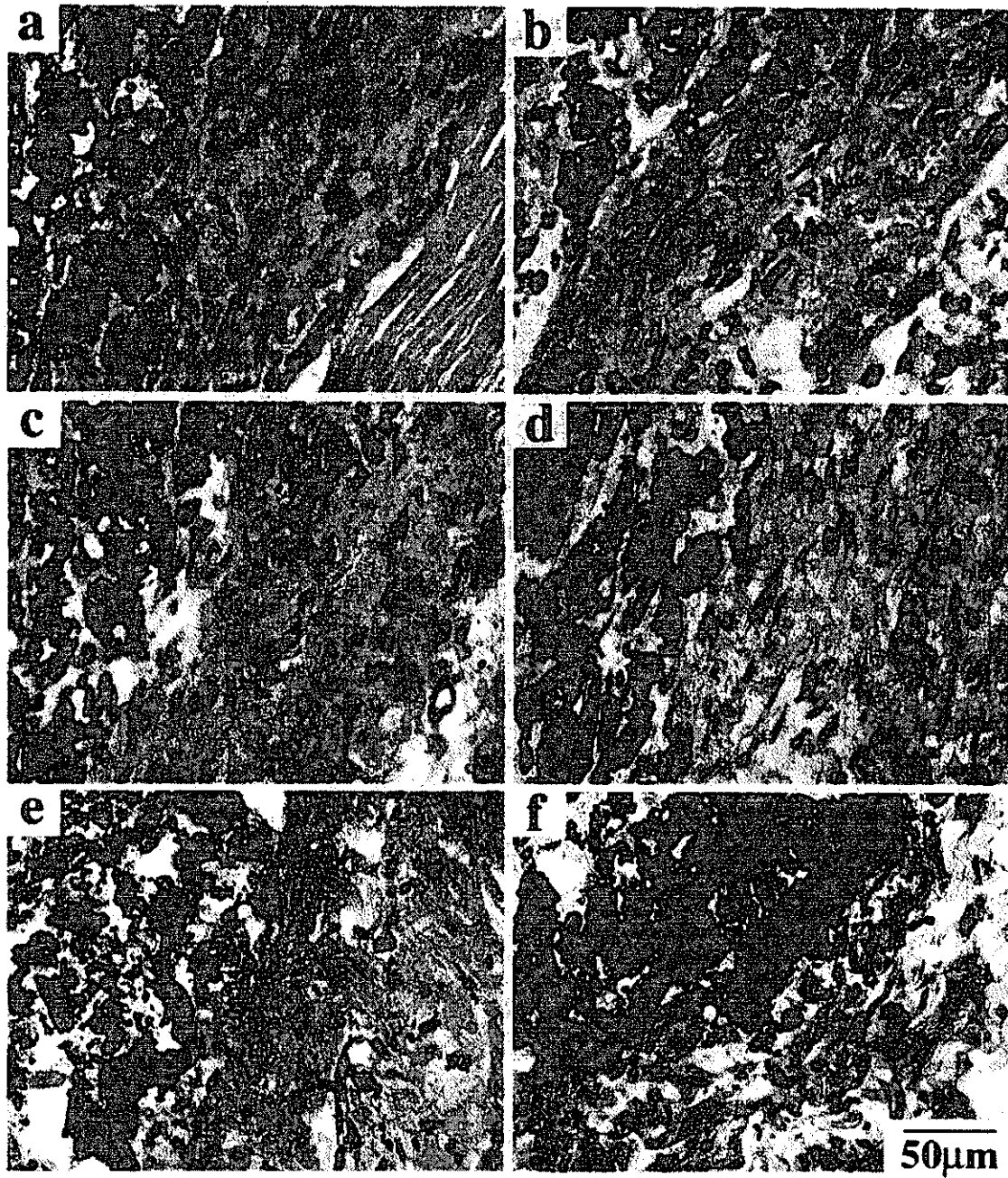


図10 微粒子を埋入したラット軟組織の反応。上(a, b) : 1週後、中(a, b) : 4週後、下(a, b) : 8週後。左(a, c, e) : チタン、右(b, d, f) : 窒化チタン。4週頃まで炎症性細胞浸潤、マクロファージによる貪食が顕著である。8週にかけて粒子は次第に凝集してきている。

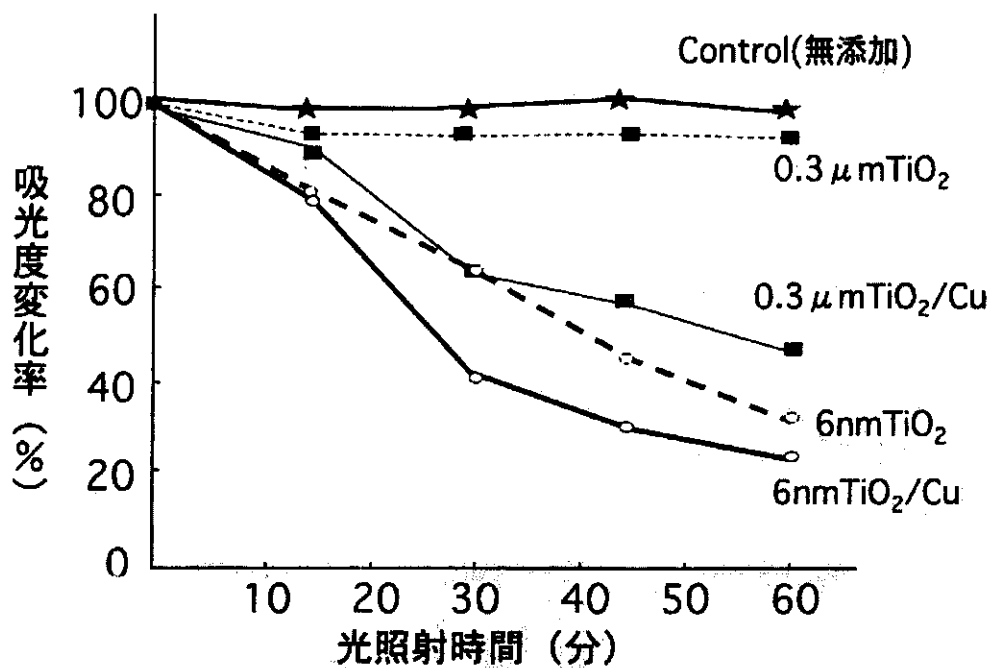


図 1 1 可視光照射下のCuイオン修飾二酸化チタンの光触媒作用

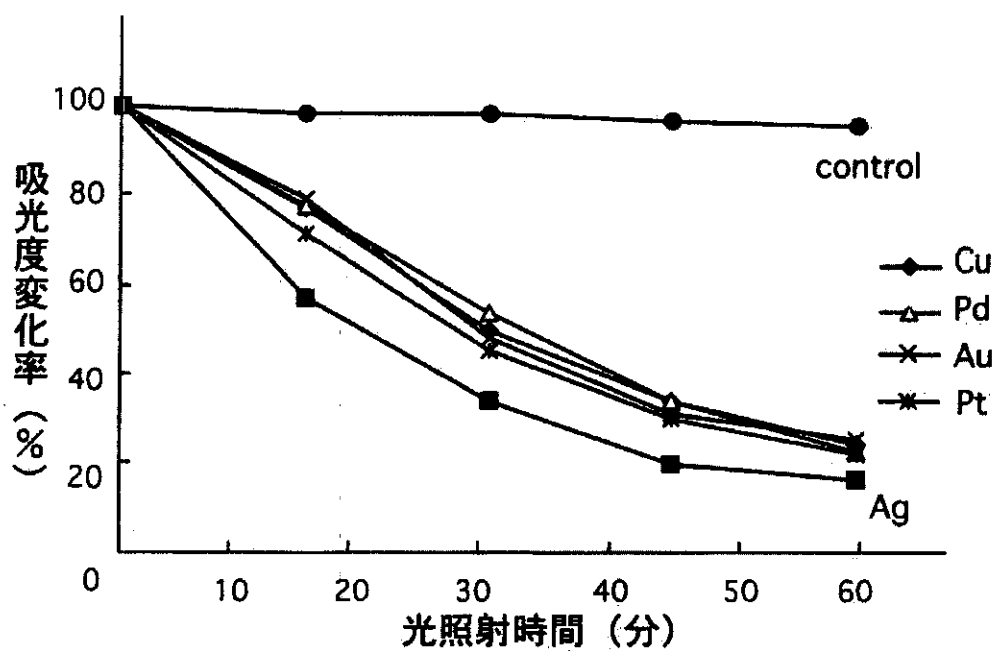


図 1 2 可視光応答型光触媒能の修飾金属イオン種依存性

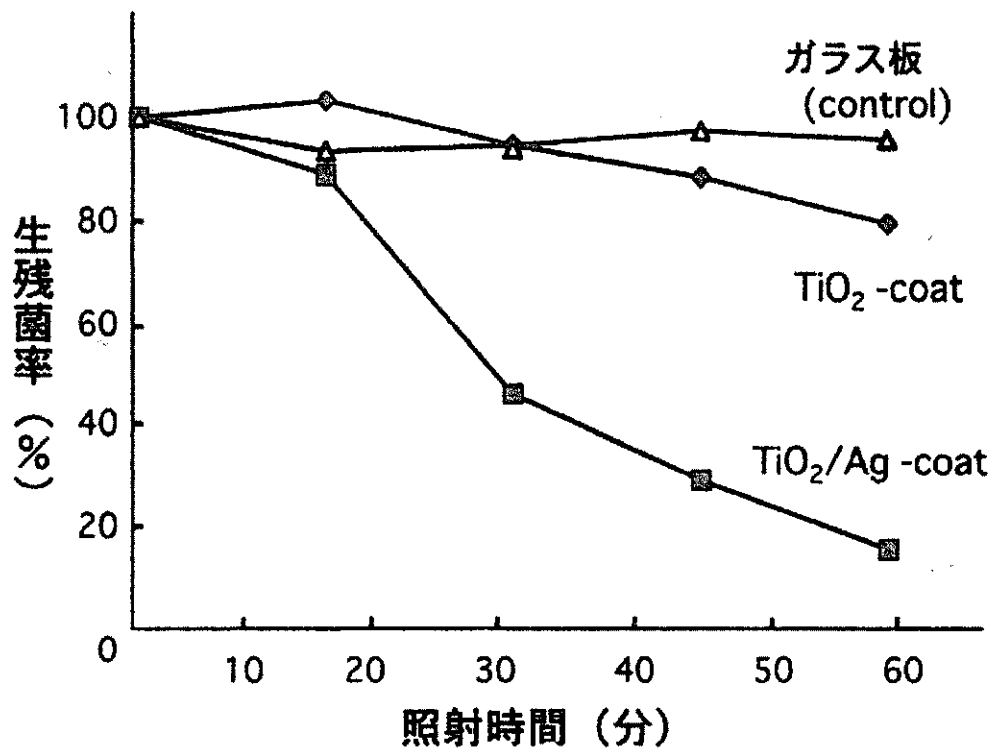


図1.3 *streptococcus mutans*に対するAgイオン修飾二酸化チタンの抗菌効果

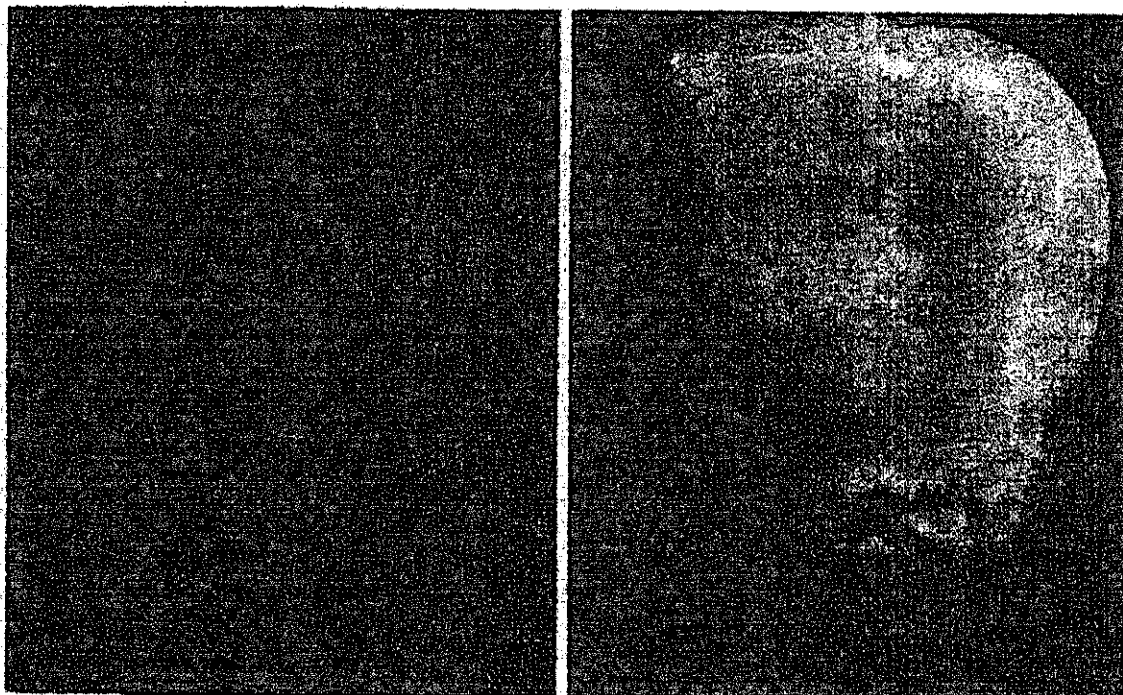


図1.4 可視光応答型Agイオン修飾二酸化チタン光触媒によるヒト天然歯の歯牙漂白効果。
左：漂白前、右：漂白後。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

X線を用いたナノ領域分析手法開発に関する研究

主任研究者 亘理文夫 北海道大学歯学研究科教授
研究協力者 朝倉清高 北海道大学触媒化学研究センター教授

X線を用いたナノレベル分析手法の開発に取り組んでいる。一つはEXAFSと呼ばれる手法であり、ナノチューブ、ナノロッド内の金属触媒の構造を明らかにした。もう一つはEXPEEMと呼ばれる新しいタイプの電子顕微鏡であり、ナノ領域の化学分析を可能にする。

A. 研究目的

ナノチューブ、ナノ微粒子の生体適合性を調べ、DDSや組織代替材料に応用するためには、こうした微粒子の構造を生体環境またはそれに近い環境で調べる必要がある。この目的を達成するためには、透過力の大きな光であるX線が有効である。X線は内殻の電子を励起できるだけの十分なエネルギーを持つ光である。内殻電子は元素固有の束縛エネルギーで原子に結合しているため、X線の波長を掃引したり、飛び出してきた光電子の運動エネルギーを調べることで、元素の種類を特定し、その電子状態や周辺構造を調べることができる。こうした手法を用いてナノ粒子の構造解析やナノ領域の化学反応を追跡するための以下の2手法開発に取り組んでいる。

B1. 研究方法 EXAFS法によるナノチューブ中の金属触媒の構造解析

X線のエネルギーを掃引して、その吸収スペクトルを測定すると、図1に示すように、特定のエネルギー位置でX線吸収係数が急激に増大する吸収端が現れる。この吸収端より高エネルギー側に現れる振動構造がEXAFS

(Extended X-ray Absorption Fine Structure) と呼ばれるものである。この振動構造は、光電子として放出された内殻光電子が周辺原子により散乱され、干渉しあうことで現れる。こ

の振動構造をフーリエ変換すると、動径分布関数に対応するものを与え、周辺原子までの結合距離や周辺原子の種類や配位数を決定することができる。我々は、カーボンナノロッドおよびチューブ中に存在する金属触媒の構造をこの手法で調べた。

実験は高エネルギー物理学研究機構放射光実験施設BL9Aにおいて行った。X線の波長掃引は、Si(111)2結晶モノクロメータによりおこなない、X線の検出は、電離箱（透過法）あるいはGe半導体検出器（蛍光法）を用いて行った。

C1. 研究成果

その結果、金属未除去のカーボンナノロッド中に存在するNi触媒については、図2に示すような動径分布関数が得られた。解析の結果、ピークはNi-Ni結合に対応し、その結合距離0.248 nmであり、金属微粒子として存在することが分かった。また、配位数を解析すると、バルクNiと同じ配位数であったことから、10nmを越える比較的大きな金属微粒子で存在していることがわかった。さらに、Ni除去処理後については、蛍光法により測定した。蛍光強度より、Niの存在量は約100ppm程度であると推定された。Ni-Ni結合に対応するピークがわずかに観測される他、Ni-Cのピークが観測された。残存したNiは、Cと強く結合しているものと考えられる。吸収端付近のスペクト

ル構造はから、(図4) 平面または直線型構造をしているものと推測される。

一方、カーボンナノチューブ合成用NiFe触媒においては、FeがFcc構造をとり、合金化している事がわかった。(図5) さらに、NiFeの合金微粒子は、1-3nm程度の大きさであると推定される。

D1. 考察

EXAFSは100ppmという微量な条件においても金属の構造を調べることができる。得られる情報は、金属の存在状態である。今回カーボンナノロッド中の金属の構造を調べたが、実際に生体に応用する場合は、金属を除去することになる。金属除去後の構造として、カーボンと強く結びついた状態で存在しており、カーボンナノロッドに強く結びつくことから、溶出等による影響は少ないものと考えられる。

E1. 結論

EXAFSは、微量金属の構造を原子レベルで調べることができ、カーボンナノロッド中に微量に残存する金属はナノロッドと強く結びついた状態で存在することがわかった。

B2. 実験方法—EXPEEM法の開発

EXPEEM(energy filtered X-ray photoemission electron microscopy)法は、ミクロンからナノの領域における元素分析能をもち、非破壊性も高いという特徴を有する。さらに、ガス共存下でのin-situ分析も可能である。われわれは、光軸が直線上になるWien filterをエネルギー分析器として持つEXPEEM装置を開発した。(図6) Wien filter中では、電場Eと磁場Bを直交して存在する空間をもつ。この空間を電子が走ると、電場と磁場からお互いに反対向きの力を受ける。磁場から受けるローレンツ力は、電子の速度に比例することから、特定の運動エネルギーを持つものだけが直進する。この直進した電子を選別することで、電子の運動エネルギー分析し、表面の化学マッピングが可能となる。

C2. 実験結果

放射光を用いて、我々は、Au/Taの元素分解能を1-2 μ mという空間分解能をもつ光電子放出顕微鏡像を高エネルギーX線領域ではじめて測定することができた。図7に光電子の運動エネルギーを分析したEXPEEM像を示す。0-80 eVの運動エネルギーで結像するとほぼ、Au領域が明るい。これは、Au領域から放出される光電子が多いためである。一方、102eVでは、Ta_{3p_{3/2}}のピークに対応すること

から、Taのピークの方が明るくなる。さらに高くなると、Taのピークを過ぎるため、ほぼコントラストがなくなる。

D2. 考察

これまで、Wien filterを用いたEXPEEMは感度が小さく、実用化は難しいと考えてきたが、本研究によりその可能性が示された。現在さらに、Wien filterの高感度化の取り組みを続けている。

E2. 結論

X線を用いたnmオーダーの元素マッピングを可能とするEXPEEM法を開発した。より高い感度を目指した改良を今後行う。

F. 健康危険情報

本研究において、特記する健康危険情報はない。

G. 研究発表

- 1) C. R. Bian, S. Suzuki, K. Asakura, L. Hei and N. Toshima, "EXAFS studies on the structure of the PVP-Stabilized Cu/Pd particles colloiddally dispersed in solution", *J.Phys.Chem.*, **106**,8587-8598(2002). Yamaguchi, A.; Suzuki, A.; Shido, T.; Inada, Y.; Asakura, K.; Nomura, M.; Iwasawa, Y.; *J.Phys.Chem.* **2002**, *106*, 2415-2422.
- 2). Yasufuku, Y. Ohminami, T. Tsutsumi, K. Asakura, M. Kato, Y. Sakai, Y. Kitajima and Y. Iwasawa, "Observation of Energy Filtered Image for X-ray Photoemission Electron Microscopy(XPEEM) Using a Retarding Wien Filter Energy Analyzer", *Chem.Lett*, 842(2002).
- 3) A. Yamaguchi, A. Suzuki, T. Shido, Y. Inada, K. Asakura, M. Nomura and Y. Iwasawa, "In-situ time-resolved energy dispersive XAFS study on the decarbonylation processes of Mo(CO)₆ entrapped in NaY and HY zeolites", *J.Phys.Chem.*, **106**,2415-2422 (2002).
- 4) T. Shido, A. Yamaguchi, Y. Inada, K. Asakura, M. Nomura and Y. Iwasawa, "Dispersive XAFS study on Cu and Mo species in zeolites during the catalyst preparation", *Topics in Catal.*, **18**,53(2002).
- 5) R. S. Mulukutla, T. Shindo, K. Asakura, T. Kogure and Y. Iwasawa, "Characterization of rhodium oxide nanoparticles in MCM-41 and their catalytic performances for NO-CO reactions in excess O₂", *Applied Catalysis A*, **228**,305-314(2002).
- 6) K. Ijima, Y. Ohminami, S. Suzuki and K. Asakura, "Polarization dependent EXAFS measurements of an alpha-molybdenum trioxide single crystal", *Topics in Catal.*,

18,125-127(2002).

7) 田旺帝、朝倉清高 “XAFSシリーズ(15)In-situ 偏光全反射蛍光XAFS(in-situ PTRF-XAFS)法”, 放射光, 15,363-366(2002)

2. 学会講演

1) 朝倉清高、安福秀幸、大南祐介、堤哲也、北島義典、嘉藤誠、境悠治、岩澤康裕 “放射光を用いたX線光電子放射顕微鏡の開発と固体表面のエネルギー選別像の観測” 日本化学会第81春季年会,早稲田大学(2002/03/27)

2) 安福秀幸、朝倉清高、大南祐介、堤哲也、北島義典、嘉藤誠、境悠治、岩澤康裕 “放射光を用いたWien Filter型X線光電子放射顕微鏡によるエネルギー選別像の観測”, 第49回応用物理学関係連合講演会,東海大学(2002/03/27)

3) 鈴木あかね・山口有朋・千原貞次・紫藤貴文・稲田康宏・朝倉清高・野村昌治・岩澤康裕 “

時間分解 DXAFS 法による担持[Ru₆C]クラスター触媒の構造速度論に関する研究” 日本化学会第81春季年会,早稲田大学(2002/03/27)

4) 鈴木あかね・山口有朋・千原貞次・稲田康宏・紫藤貴文・朝倉清高・湯浅真・阿部正彦・野村昌治・岩澤康裕 “In-situ 時間分解 DXAFS によるRu クラスター触媒の構造速度論に関する研究” 第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/1)

5) 鈴木あかね・山口有朋・千原貞次・稲田康宏・紫藤貴文・朝倉清高・湯浅真・阿部正彦・野村昌治・岩澤康裕 “in-situ 時間分解 DXAFS 法によるRh/Al₂O₃ 触媒の構造変化に関する研究”, 第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/1)

6) 河合寿秀、佐藤慎祐、朝倉清高、阪東恭子、松井高史、葭村雄二、久保田岳志、岡本康昭、Yong-Kul Lee、S.Ted Oyama、 “In situ EXAFS を用いたニッケル-リン化合物脱硫触媒の構造研究”

¥第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/1)

7) Cui-Rong Bian, 朝倉清高, Lu Ping, 戸嶋直樹, “EXAFS によるCuPd 合金超微粒子の構

造”

第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/2)

8) 能登屋康晴、早川久仁子、藤川高志、金崎真吾、紫藤貴文、朝倉清高、岩澤康裕、 “

多重散乱理論によるC₂H₄/Pt/SiO₂ 系のL-edge XANES スペクトル解析” 第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/2)

9) 堤哲也、大南祐介、朝倉清高、安福秀幸、嘉藤誠、境悠治、北島義典、岩澤康裕, “Wien Filter型EXPEEMによるAu/Taの光電子エネルギー選別像と分散像の観測”, 第22回日本表面科学会,早稲田大学 (2002/11/27)

10) 河合寿秀・佐藤慎祐・朝倉清高・坂東恭子・松井高史・葭村雄二・久保田岳志・S. Ted Oyama・Yong-Kul Lee, “EXAFSを用いたニッケル・リン化合物脱硫触媒の構造研究”, 第90回触媒討論会、浜松、(2002/9/21)

11) 朝倉清高・Cui-Rong Bian・戸嶋直樹・Lu Ping, “高分散Cu-Pdヘテロポンドフィリック合金クラスターの構造解析”, 第90回触媒討論会、浜松、(2002/9/21)

12) Kiyotaka Asakura, “Recent Developments in the Application of Synchrotron Radiation to Catalyst and Surface Science”, 12th ROC-Japan Joint symposium on catalysis, Hualian, Taiwan, 2002. 3. 13

13) Kiyotaka Asakura “Polarization dependent XAFS studies about metal species dispersed on single crystal oxides” Seminar at Institute of atomic and molecular sciences” Taipei, Taiwan (2002. 3. 11)

14) 朝倉清高 “EXPEEM”, 第7回 CREST 成果報告会 京都, 2002. 5. 29

15) 朝倉清高 “触媒におけるPdの反応特性” 平成14年齒科理工学会 北海道東北支部 夏期セミナー、キロロ、2002. 7. 20

16) 朝倉清高, “表面化学反応と表面リアルタイムマッピング”, 第3回ナノテク支援ワークショップ, SPring8 2002. 11. 10

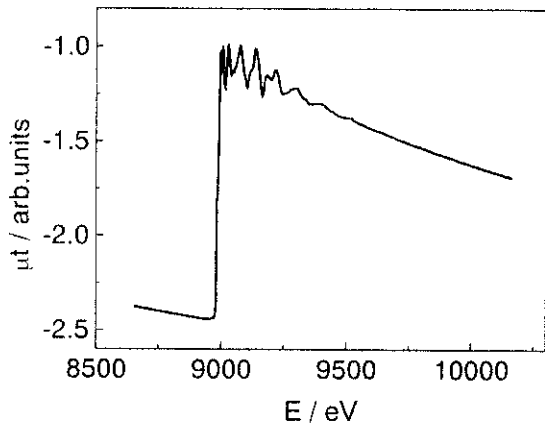


図1 Cu K吸収端XAFS スペクトル

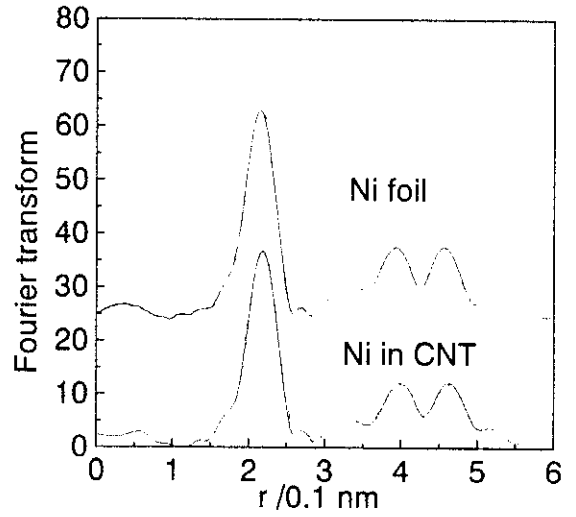


図2 フーリエ変換 上: Ni foil、下: CNT中のNi(未洗浄)

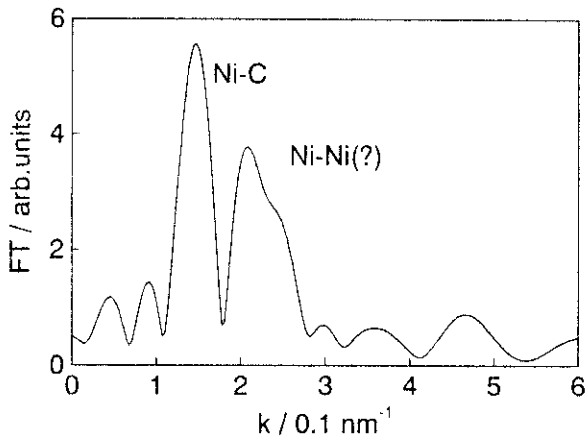


図3 洗浄処理後のNiのフーリエ変換

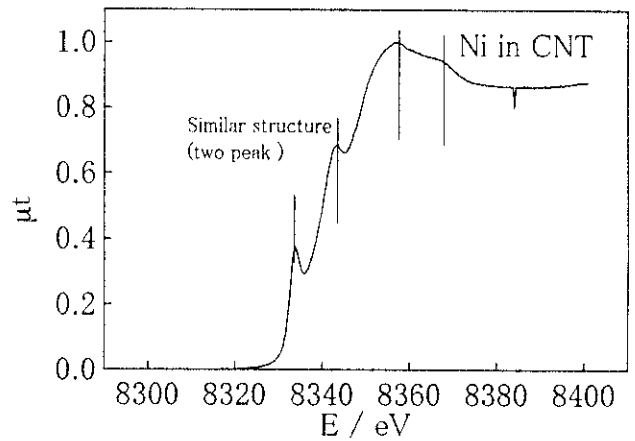


図4 カーボンナノロッド中のNiの XANES スペクトル(Ni除去処理後)

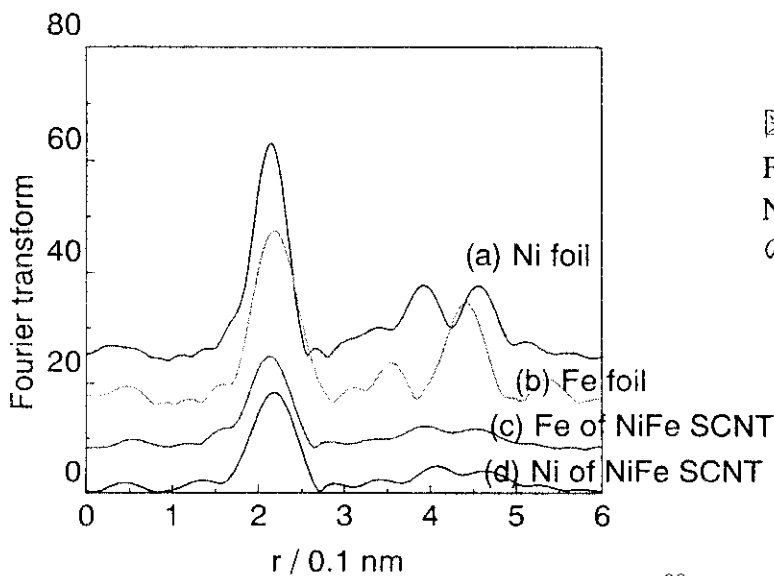


図5 フーリエ変換(a) Ni foil, (b) Fe Foil, (c) Fe K-edge in SWCNT中のNiFe 触媒 (d) Ni K-edge in SWCNT中のNiFe 触媒

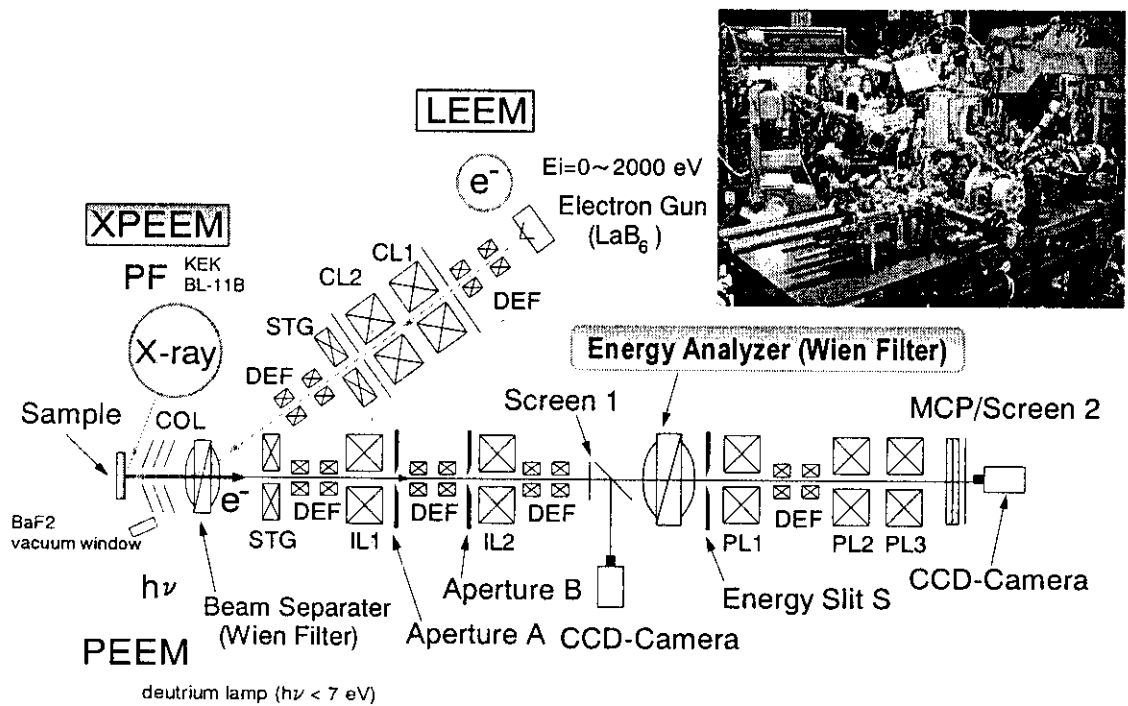


図5 XPEEM装置の概念図

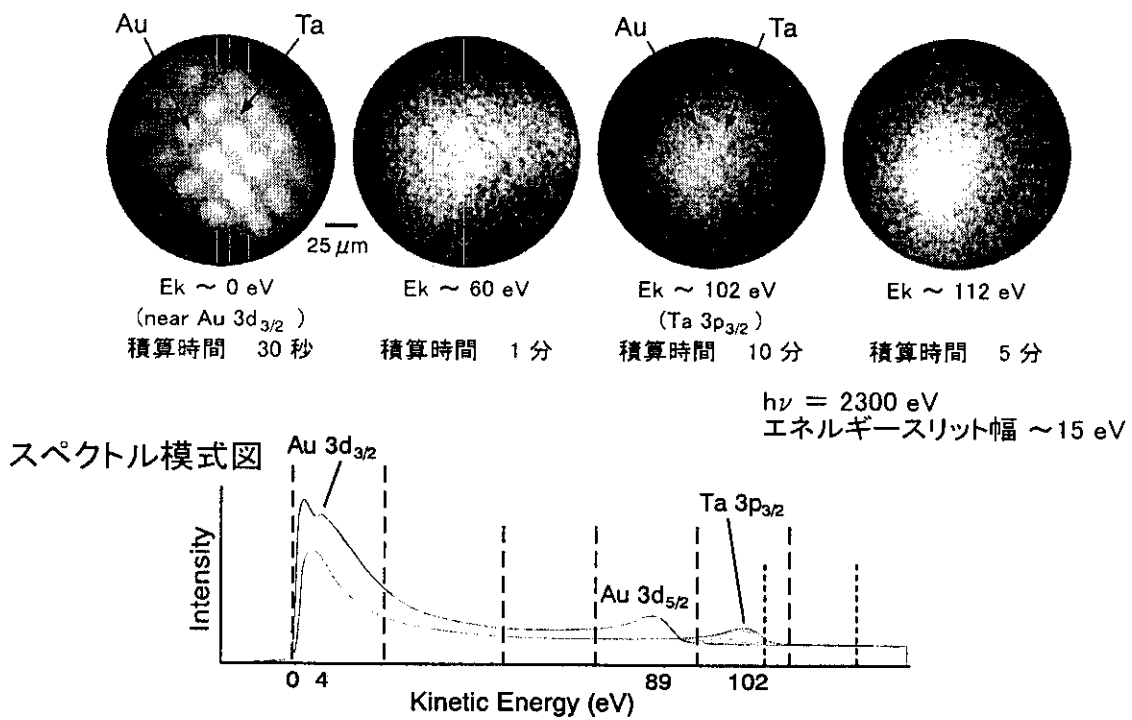


図6 エネルギー選別像(上) それぞれの図のしたに選別した電子のエネルギーを記した。スペクトル模式図(下) には、どの光電子ピークを結像したものかを示した。

カーボンナノチューブ類の化学処理・サイジングと遺伝子導入への試み

主任研究者 亘理文夫 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座

研究協力者 古月 文志 (北海道大学大学院理学研究科)、進藤 正信(北海道大学大学院歯学研究科)、野田坂 佳伸 (北海道大学大学院歯学研究科)、柴 肇一 (富士レビオ株式会社)

研究要旨 カーボンナノチューブを分散・可溶化し、組織反応実験用のマトリックスとして供給することを第一の目標として研究を行い、カーボンナノチューブを分散させるには、両性イオンミセルである CHAPS ミセルが有効であることが明らかになった。この可溶化されたカーボンナノチューブ・ナノロッドを用いた遺伝子導入のためのナノデリバリーシステムを開発することを目的に、カーボンナノチューブに anthraquinone-1-diazonium のようなインタカレータを結合させ、その後、インタカレーション結合で核酸を結合することが可能となった。

A. 研究目的

カーボンナノチューブは、次世代の省エネルギーかつ高輝度の画面平面表示フィールドエミッションディスプレイ(FED)の冷陰極電子源の材料として注目されていることに加えて、水素などのガス貯蔵材料、リチウム電池の陰極剤などの電池材料、複合金属材料、ないしナノメディシン材料など、様々な分野への応用が期待されている。これらの近未来のナノ事業を推進・加速させるためには、先ず、量と質の両面からカーボンナノチューブを提供する必要があると思われる。カーボンナノチューブの量産に関する技術は研究が進んでいるが、一方、質的に実用に足るものを得るための方法は殆ど確立されていない。カーボンナノチューブは、溶媒に溶けない「固体物質」であったことから「反応場」を持たせることができ

ず、さらなる精密な化学処理や、同じ長さ・太さを持つチューブを分離したりするなどの化学的修飾作業をすることが困難であった。物理分野ではカーボンナノチューブの分離・精製がよく報告されているが、これらの多くは、カーボンナノチューブをほかのカーボン(アモルファスカーボンやグラファイト)から分離するものであり、化学分野が目指すチューブ自身の長さや太さを選別調整するものではない。さらに、このカーボンナノチューブは生物学的な面からの研究はほとんど為されていないが、素材がカーボンであるため生体・細胞への為害作用はないと考えられ、生物学的応用は意味のあるものと思われる。我々の研究グループは、独自に開発した化学処理法を用い、カーボンナノチューブの分離・選別と表面加

工に関する研究を行い、バイオ応用への試みをおこなった。

B. 研究方法

1. カーボンナノチューブ類 (カーボンナノチューブまたはカーボンナノロッド) の分離・選別

Extruderは元々リポソームの調整・サイジングのために開発された装置である(図1)。このExtruderを用いてカーボンナノチューブの分離・選別を行った。

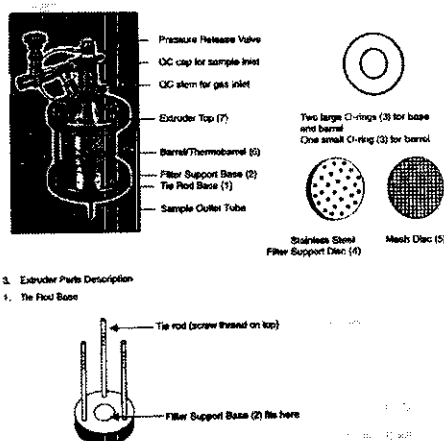


図1、LIPEX™ EXTRUDER

2. カーボンナノロッドへの核酸の結合とその確認

カーボンナノロッドに、anthraquinone-1-diazoniumのようなインタカレーターを結合させ、その後、インタカレーション結合でβ-Gal発現プラスミドを結合し、結合の有無をPCRにより検討した。

Nano-tube solution 500 μl を DW 1 ml で10回洗浄後、DDW 100μl に溶解した。PCR反応は以下の通り行った。

Nano-tube solution	1μl
Taq Buffer	2.5μl
Taq polymerase	0.125μl
Primer (β-gal) sense	0.5μl

anti sense 0.5μl

DW 18.375μl

Total 20μl

PCR program 95°C 5min

94°C 30s

60°C 30s

72°C 90s

Positive control として pCMV β-Gal を 0.1ng 使用。同様のプロトコールで PCR を Cycle 数 15、25、35 回で行い、sample を 1.5% agarose gel 電気泳動した。

3. pCMV β-Gal結合ナノロッドを用いた細胞への遺伝子導入

発現プラスミドのナノロッドへの結合が確認されたため、H1299細胞にリン酸カルシウム法で遺伝子導入を試み、結果をβ-Gal assayにより確認した。

C. 研究結果

市販のカーボンナノチューブ類は、太さと長さの観点から見ると、極めて不均一な物質であることが超微形態的観察により明らかになった。

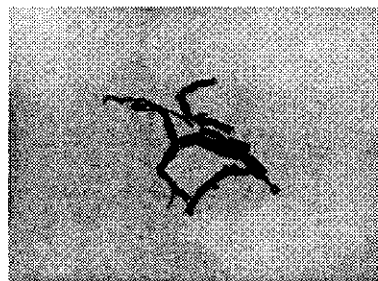


図2 未処理のカーボンナノチューブ

対象のカーボンナノチューブ類を長さ・太さ毎に分離・選別するには、完全な分散が求められている。現在のところ、長さが100 nm、400 nm、600 nm、800 nm、及び1000 nm程度のカーボンナノチューブ類を分離・選別することがで

き、1グラムのカーボンナノチューブ類を処理する所要時間は半日程度であった。

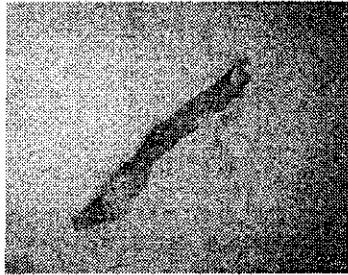


図3 100nmのフィルターで分離・選別を行ったカーボンナノチューブ

インターカレーター-anthraquinone-1-diazoniumをカーボンナノロッドに結合し、インターカレーター型カーボンナノロッドを作製した。

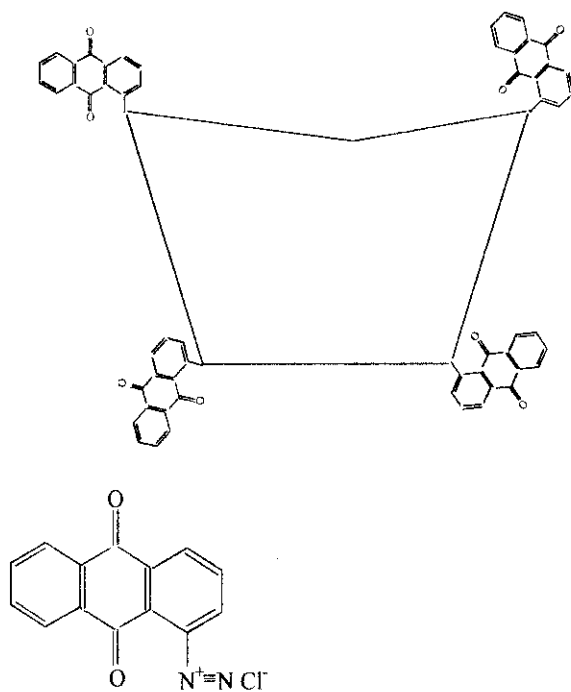


図4 インターカレーター型カーボンナノロッドの模式図

カーボンナノロッドの表面構造の変化を超微形態的に観察した。

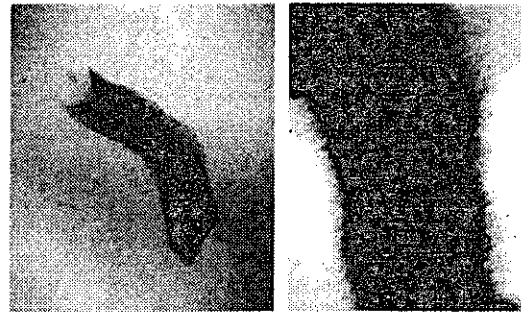


図5 処理前 インターカレーター付加カーボンナノロッド

このインターカレーター型カーボンナノロッドにCMVプロモーターの下流にlacZ遺伝子を組み込んだpCMV-βGal発現プラスミドをインターカレーション反応によって結合を試みた。結合の有無をPCRによって検索したところカーボンナノロッド/pCMVβ-Galの結合が確認された。

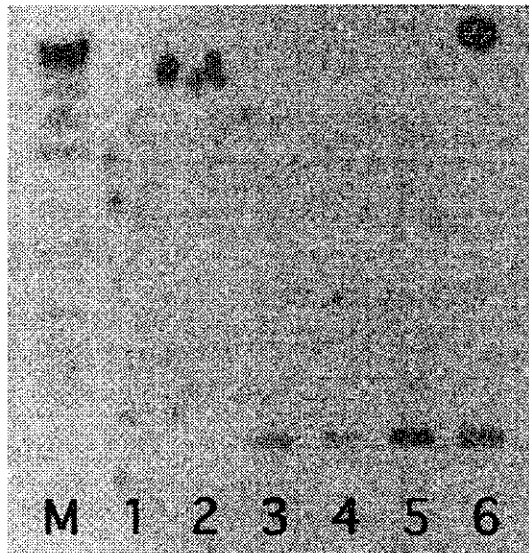


図6 M;Marker Lane1,3,5;pCMVβGal lng (positive control), Lane2,4,6; nonrod/pCMVβGal Lane1,2; PCR 15cycle, Lane3,4; 25cycle, Lane 5,6;35cycle

このカーボンナノロッド/pCMVβ-Galをリン酸カルシウム法を用いてH1299細胞への遺伝子導入を試みたが発現は認め

られなかった。

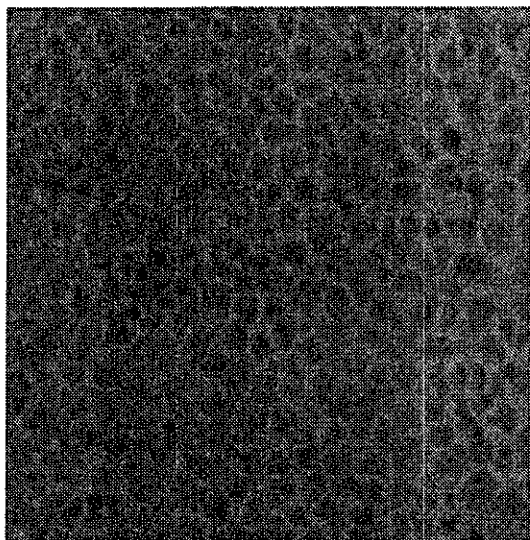


図7 β -Gal assay。遺伝子導入を試みたH1299細胞に発現陽性所見は認められない。

この遺伝子導入に用いたカーボンナノロッド/pCMV β -Galの形態を超微構造的に検索した。その結果、今回用いたカーボンナノロッドは直径200nm全長2 μ mの桿状物質であることが明らかになった。



図8 ナノロッド/pCMV β -Galの電顕像

D. 考察

カーボンナノチューブ及びカーボンナノロッドを分散・可溶化するには、下記のような処理手順が有効であることが明

らかになった。

1. 80°Cで良く乾燥したカーボンナノチューブまたはカーボンナノロッド約500mgを秤量し三角フラスコに入れ、約40ml過塩素酸水溶液を加え、90°Cの恒温槽で一晩中放置し、金属触媒をはじめ他の不純成分の酸化・除去を行う。
2. 炭酸ナトリウムを加え、残留した過塩素酸を中和する。この際、発生した炭酸ガスは、カーボンナノロッド又はカーボンナノチューブの凝集を防ぐ効果がある。
3. 両性イオン界面活性剤、CHAPSを加え、CHAPSの濃度が約30 mMになるように調整する(カーボンナノロッドあるいはカーボンナノチューブの分散を更に良くするため)。
4. LIPEX™ EXTRUDERを使って、カーボンナノロッドあるいはカーボンナノチューブを洗浄する。洗浄液として、脱イオン水、50%アセトニトリル、脱イオン水を順次用いる。各洗浄液を用いた洗浄回数は、10回である(電解質及び分散剤を除去するため)。最後に、3%過酸化水素で洗浄・殺菌を行う。
5. フィルター(pore size;100 nm)上に堆積したカーボンナノロッドあるいはカーボンナノチューブをビーカーに移し、脱イオン水を加えた後、超音波により脱イオン水に分散・可溶化させる(カーボンナノロッドの原液の濃度は、約2 ppm、カーボンナノチューブ(MWタイプ)原液の濃度が約0.1 ppm)。

このようにして分離・精製したカーボンナノロッドにインターカレーターを付与することによって、プラスミドを結合させることが可能であることが今回の実験により確かめられた。

細胞への遺伝子導入を試みたが、細胞内での遺伝子発現は認められなかったが、超微形態の観察によりナノロッドが長さ $2\mu\text{m}$ と大きなものであることが原因であると思われた。リン酸カルシウム法による遺伝子導入実験ではリン酸カルシウムの結晶が小さすぎても大きすぎても導入効率は減少することが知られており、その至適サイズは 200nm であるとされている。今後、ナノロッドの切断・微小化あるいはウニ型ナノチューブの応用により、細胞への遺伝子導入のツールとしてカーボンナノチューブ・ナノロッドを用いる可能性が示された。

E. 結論

カーボンナノチューブおよびカーボンナノロッドは過塩素酸を使うことで、最も高い精製収率が得られることが明らかになった。一方、分散・あるいは可溶化にはCHAPSのような両性イオンミセルを使用することが最も効果的であった。

このように精製・可溶化されたカーボンナノチューブ・ナノロッドにインターカレーターを付加することによって核酸を結合することが可能となり、遺伝子導入のツールとしてのバイオ応用への道が開かれた。

分担研究報告書

カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用

主任研究者 亘理 文夫 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座
研究協力者 赤坂 司 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座
研究協力者 宇尾 基弘 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座

研究要旨 カーボンナノチューブ (CNT) のバイオ分野での利用を目的とし、細胞との相互作用を観察するため CNT のビオチン化を検討した。湿式酸化を行い MWCNT にカルボン酸を導入し、ビオチンアミノ誘導体との縮合反応を行った。得られた MWCNT-Biotin は良好な分散性を示したことより MWCNT がビオチン化された可能性が高いと考えられる。次に CNT の持つ様々な特性を利用して細胞培養担体として利用可能か検討するため、MWCNT/PSS を調製しアミノ表面を持つスライドガラスへの固定化を試みた。その結果、固定化条件（濃度と塩酸添加）を調整することにより固定化できることが明らかとなった。

1. バイオ研究用カーボンナノチューブ試薬の合成

A. 研究目的

カーボンナノチューブ (CNT) は炭素原子の六員環ネットが円筒状に閉じた直径がナノメートルスケールの中空チューブである。製造法の違いにより単層、多層や直径、長さ等の異なる CNT が合成でき、電子物性と長さや形などの形状特性を組み合わせることによってエレクトロニクスやエネルギー分野を中心に様々な分野で新たな現象や特性が引き出されると期待されている。その中で CNT のバイオ分野への検討もいくつか始まっており走査トンネル顕微鏡の探針やタンパク質の結晶化等への応用が注目されている。CNT のさらなる

バイオ分野への展開のためには、CNT と細胞との相互作用や実験系での CNT 局在の観察などの基礎的な検討が必要となってくる。本研究ではバイオ研究で有用である金微粒子や蛍光にてラベル可能な CNT 誘導体の合成を試みた。

B. 研究方法

多層カーボンナノチューブ (MWCNT: NanoLab 社製、純度 80%) を 100mg とり、30%過酸化水素 75mL 加え 6 時間還流した。次にテフロン製遠沈管へ移し遠心分離 (2500g、10 分間) 後、上澄み液を除いた。沈殿物を洗浄するため脱イオン水を加え再び遠心分離し、残留した過酸化水素を除いた。続いて 6N 塩酸 75mL を加え一晩還流し、上記と同様に遠心分離と洗浄

を行った。得られた沈殿物をシャーレ上で加熱乾燥(80°C)し、酸化型精製 MWCNT とした。酸化型 MWCNT の形態観察は走査型電子顕微鏡 (SEM: 日立社製 S-2380N) を用い、赤外吸収スペクトル測定はフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR: 日本分光株式会社製 FT/IR-300E) を用いて KBr 法にて実施した。

次に酸化型精製 MWCNT (2mg) を 10mL の脱イオン水に加え、超音波洗浄器 (35kHz) にて 10 分間分散させた。この溶液に縮合剤として 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride (EDC、26mg) と N-Hydroxy sulfosuccinimide Sodium salt (NHS、29mg) を加えた後、30 分間室温にて活性化した。続いて (+)-Biotin-(PEO)3-amine (MolecularBioSciences 社製、10mg) を加え、時々超音波にて分散させながら 6 時間縮合反応を行った。精製は限外ろ過装置 (攪拌式セル Model 8050、アミコン) を用い、0.45 μ m のろ過膜にて脱イオン水 200mL、70%エタノール 200mL、脱イオン水 200mL の順に洗浄を行った。ろ過膜上の残渣を脱イオン水 (40mL) に分散させ、ビオチン化 MWCNT (MWCNT-Biotin) とした。

C. 研究結果

30%過酸化水素を用いて MWCNT の湿式酸化を行い、得られた加熱乾燥物をアルミ支持台に付着させ SEM 観察した結果を図 1 に示した。その結果、MWCNT は曲がった線状をしており、MWCNT の他に塊状物質が観察された。KBr 法を用いた FT-IR 測定結果 (図 2) より、原料の MWCNT と同様に MWCNT 由来の明らかな吸収は示さず、湿式酸化に特徴的なカルボニルの吸収 (1650 cm^{-1} 付近) も観察されなかった。一

方、脱イオン水中での分散性を観察した結果 (図 3) では、原料の MWCNT は分散が困難であるのに対し湿式酸化後の MWCNT は部分的な集塊はあるが良好な分散性を示した。また湿式酸化後の MWCNT にビオチン化反応を行って得た MWCNT-Biotin も同様に良好な分散性を示した (図 4)。

D. 考察

CNT と細胞の作用させた場合に細胞への取り込みや局在等を観察するためには、CNT を可視化できるようラベルする必要がある。そこで金微粒子や蛍光ラベルが可能であるアビジン-ビオチンの相互作用を利用するため、CNT のビオチン化を検討することとした。CNT は湿式酸化によりカルボン酸が導入可能であることが知られているので、はじめに CNT を酸化型に変換し、得られた酸化型 CNT をビオチンのアミノ誘導体と縮合反応させることによりビオチン化 CNT (CNT-Biotin) の調製を試みた。MWCNT を 30%過酸化水素にて湿式酸化し KBr 法を用いた FT-IR 測定を行ったところ (図 2)、カルボニル基導入を示す 1650 cm^{-1} 付近の吸収は観察されなかった。一方で水溶液への分散性は湿式酸化後の MWCNT の方が原料よりも明らかに良好であった。一般的に湿式酸化した CNT は、親水性基であるカルボン酸が導入されることと末端の炭素構造が欠落しチューブ内部へ水が入り込むことが可能であるため水溶液中での分散性が向上すると考えられている。今回湿式酸化した MWCNT も水溶液中での分散性が向上していることより MWCNT へカルボニル基は導入されていると推測された。導入を確認するためには KBr 法に比較しより測定が適していると考えられる拡散反射

型 FT-IR 測定を実施するか、またはビオチン化まで行った後にラベル化されたアビジンを結合させ間接的にカルボニル基の導入を確認することとした。

次に水溶性縮合剤 (EDC および NHS) を使用し酸化型 MWCNT とビオチンアミノ誘導体とを反応させることにより、ビオチン化 MWCNT (MWCNT-Biotin) の合成を検討した。反応後、得られた MWCNT-Biotin の分散性を評価したところ、縮合反応前よりも分散性がわずかであるが向上したようであった。現段階では MWCNT-Biotin が合成できているか確認できていないが、今後は MWCNT-Biotin へ金微粒子でラベルしたアビジンを作用させ、電子顕微鏡にて観察することにより実際にビオチン化されているか確認する予定である。

E. 結論

CNT と細胞の相互作用を観察するため MWCNT のビオチン化を検討した。湿式酸化を行い MWCNT にカルボン酸を導入し、ビオチンのアミノ誘導体との縮合反応を行った。得られた MWCNT-Biotin は良好な分散性を示したことより MWCNT がビオチン化された可能性が高いと考えられる。

2. 細胞培養 CNT 担体の調製

A. 研究目的

近年、医学や歯学を中心に新しい治療方法として再生医療が注目を集めている。使用目的に適した細胞の培養方法や培養担体の開発が望まれている。そこで本研究では CNT の持つ特異な形態、表面吸着能や電気的特性等を利用し、またさらには生理活性物質による表面修飾や CNT 自身を固体材料表面へ固定化する

ることによる機能化により、CNT が細胞培養の担体として利用できるか検討することとした。

B. 研究方法

MWCNT (NanoLab 社製、純度 80%、2mg) と吸着分散剤として Poly(sodium-p-styrene sulfonate) (PSS:平均分子量 70,000、200mg) を脱イオン水 200mL に加え、30 分間超音波処理を行い分散させた。余分な PSS を除去するため限外ろ過装置 (攪拌式セル Model 8050、アミコン) を用いて 0.45 μ m のろ過膜にて脱イオン水 200mL にて洗浄を行った。ろ過膜上の残渣を脱イオン水 100mL に分散させ、PSS で表面吸着した MWCNT (MWCNT/PSS) とした。分析のため MWCNT/PSS の一部は凍結乾燥し SEM 観察と FT-IR 測定に用いた。次にスライドガラスとして APS コートと MAS コート (松浪硝子工業株式会社) を用い、スライドガラス用 8 穴フレキシパームを接着させた。固定化条件を検討するためそれぞれのウェルに異なった濃度 (2mg/0.1L、2mg/1L、2mg/10L) の MWCNT/PSS を 400 μ L ずつ添加した。また塩酸添加の影響を検討するため上記濃度の溶液に 0.01N 塩酸 (40 μ L) を加えた固定化も行った。固定化は室温にて 24 時間静置し未固定分の MWCNT/PSS を除いた後、脱イオン水にて洗浄し 80 $^{\circ}$ C にて 15 分間乾燥させた。固定化の状態は SEM にて観察した。

C. 研究結果

PSS を MWCNT の表面に分散させながら吸着させ、凍結乾燥物の一部をアルミ支持台に付着させ SEM 観察した結果を図 5 に示した。その結果、MWCNT は 1 本 1 本とはならずローブ