

状の会合体を形成し、その会合体に PSS と推測される化合物が不均一に付着している様子が観察された。また凍結乾燥物の FT-IR 測定の結果 (図 6)、MWCNT/PSS は PSS の芳香族由来 $1400\text{--}1550\text{cm}^{-1}$ または硫酸基由来 $1000\text{--}1200\text{cm}^{-1}$ と推測される吸収が観察された。次に MWCNT/PSS 水溶液をスライドガラス上のウェルへ添加し、MWCNT/PSS の固定化に対する濃度と塩酸添加の影響を検討した。APS コートと MAS コートスライドガラス上へ固定化し、未固定化 MWCNT/PSS を脱イオン水で洗浄した後に観察した結果 (図 7)、条件により明らかな違いが観察された。両種コートの場合にて濃度が薄い場合 ($2\text{mg}/1\sim 10\text{L}$) にはほとんど固定化が観察されなかった。しかしながら $2\text{mg}/0.1\text{L}$ 濃度の場合、APS コートでは塩酸を添加すると十分な量の MWCNT/PSS が固定化され添加しないと固定化は観察されなかった (図 8、左：塩酸なし、右：塩酸あり)。一方、MAS コートでは塩酸の添加に関わらず $2\text{mg}/0.1\text{L}$ 濃度にて十分な固定化が観察された (図 9、左：塩酸なし、右：塩酸あり)。

D. 考察

CNT の形態的、電気的特性または表面吸着能等を利用して細胞培養担体としての利用の可能性を検討することとした。はじめに CNT 担体の細胞培養への影響を簡単に検討するため、培養状態が光学顕微鏡にて観察できるようスライドガラス上への CNT 固定化を試みた。アミノ基を表面に持つスライドガラスへ比較的強い物理吸着にて固定化するため MWCNT の表面にポリアニオン性高分子 PSS を吸着させたところ、PSS の持つ水溶性とポリアニオンによる反発により PSS で表面修飾した

MWCNT (MWCNT/PSS) の水溶液は良好な分散性を示した。また MWCNT/PSS 凍結乾燥物の SEM 観察による表面吸着物の存在 (図 5) や FT-IR による PSS に由来する吸収が含まれること (図 6) より、比較的容易に MWCNT 修飾が可能であることが分かった。

次にアミノ表面を持つスライドガラス (APS または MAS コート) への固定化に対する MWCNT/PSS 濃度および塩酸添加の影響を検討したところ、濃度により大きな変化が観察された (図 7)。 $2\text{mg}/1\text{L}$ または $2\text{mg}/10\text{L}$ 濃度の場合、APS または MAS コートへの固定化はほとんど起きないのに対し、 $2\text{mg}/0.1\text{L}$ では APS コートに対しては塩酸添加で、MAS コートに対しては塩酸添加に関わらず良好な固定化が観察された。これらのことより、MWCNT/PSS とアミノ表面を持つスライドガラスとの固定化は静電的結合やファンデルワールス力による結合していると考えられ、その他にもコート表面の性質や MWCNT/PSS の水溶液中での拡散速度が影響してくることが推測された。特に MWCNT/PSS の拡散速度が遅いため、効率のよい固定化のためにはある程度の濃度が必要であることが分かった。今後は、CNT の表面修飾、固定化法、3 次元的な空間の制御を考慮した細胞担体の調製を検討するとともに細胞培養への影響を検討していく予定である。

E. 結論

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検討した結果、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。

图 1



图 2

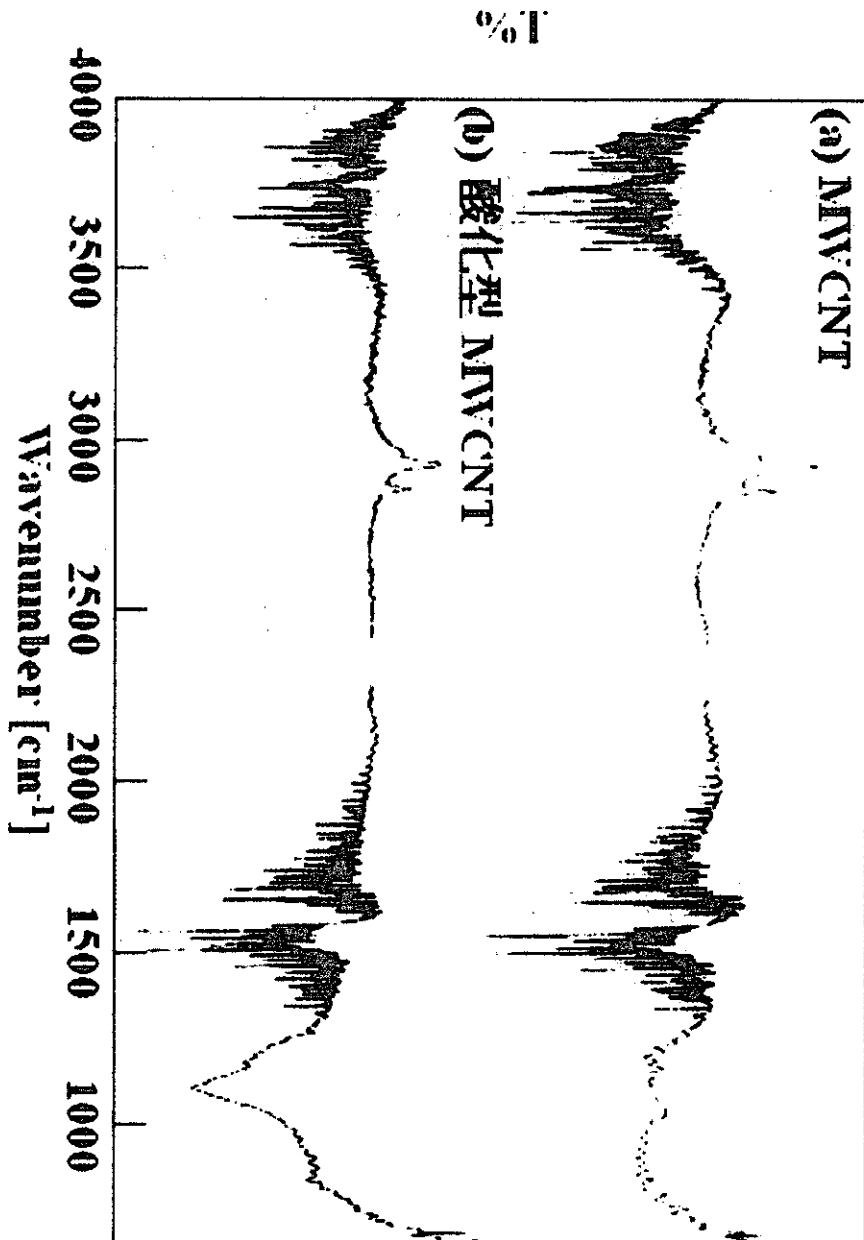
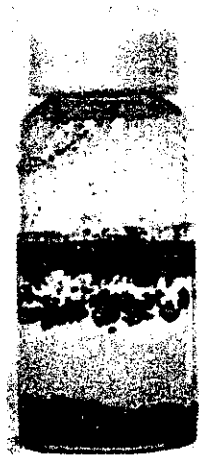


図 3

(a) MWCNT



(b) 酸化型MWCNT

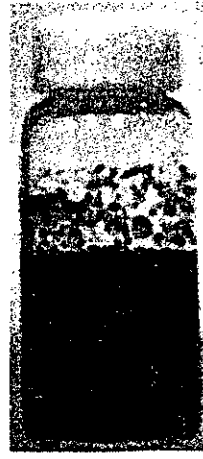


図 4

MWCNT-Biotin

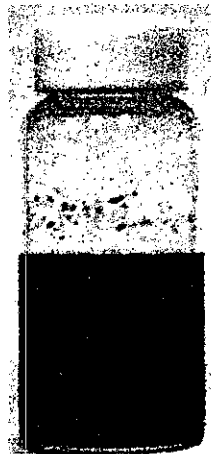


图 5

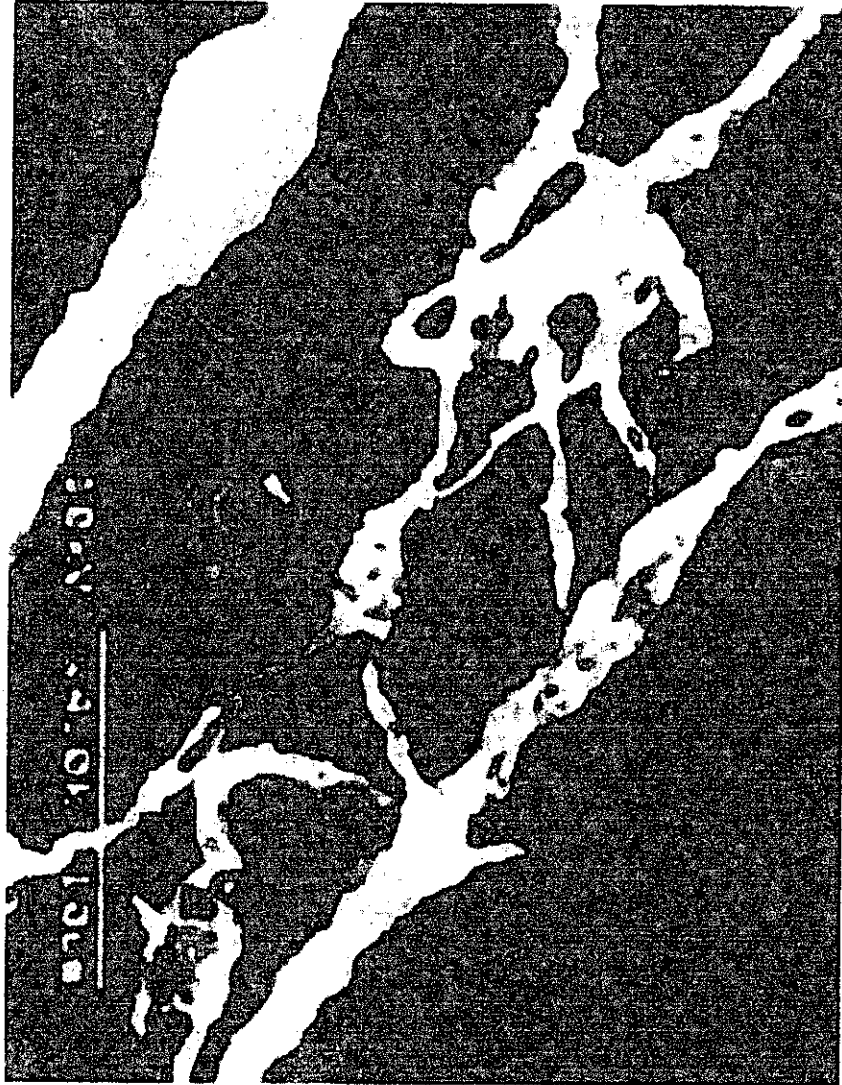
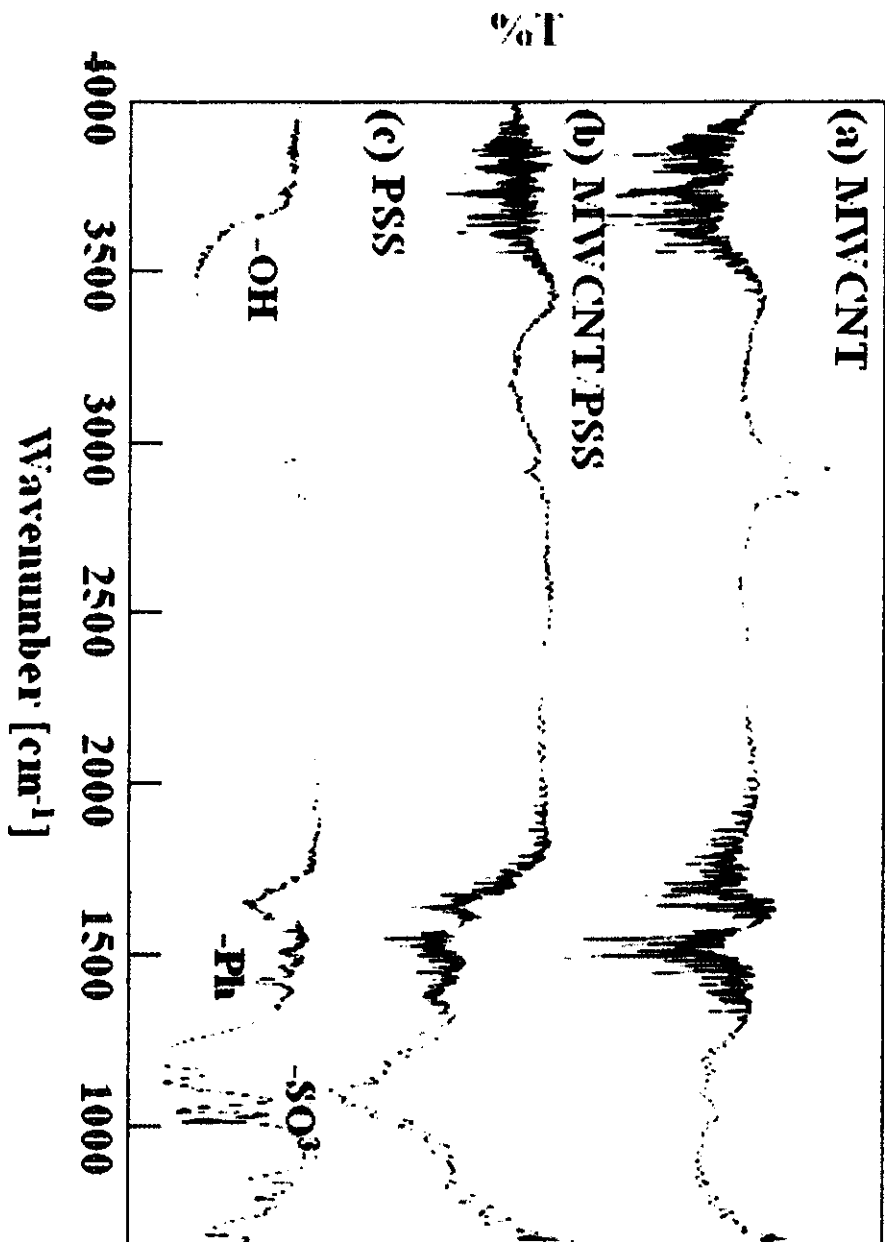
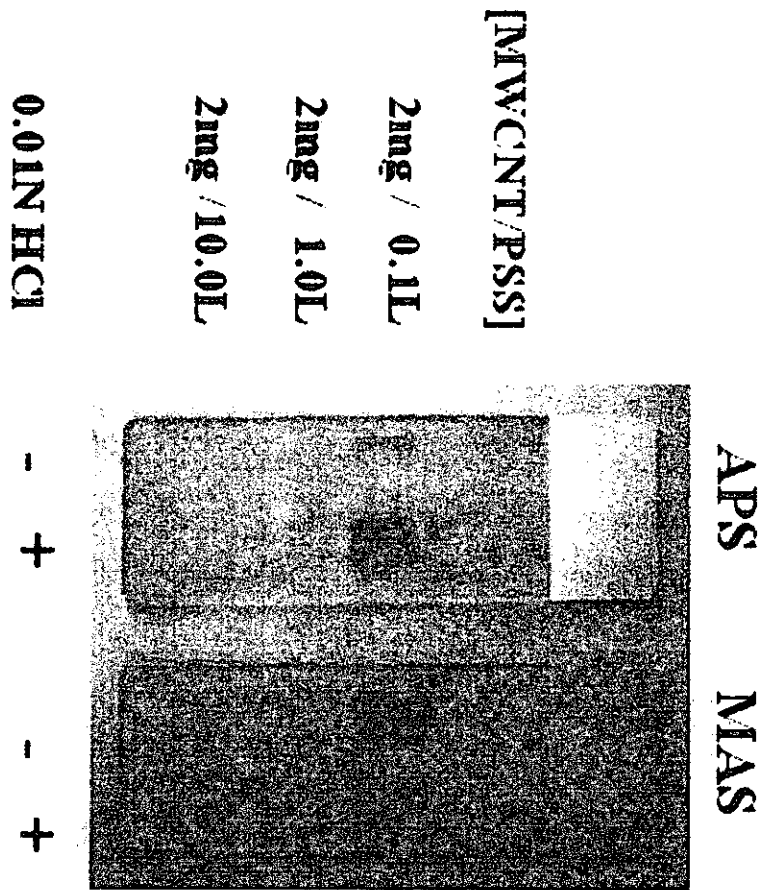


图 6





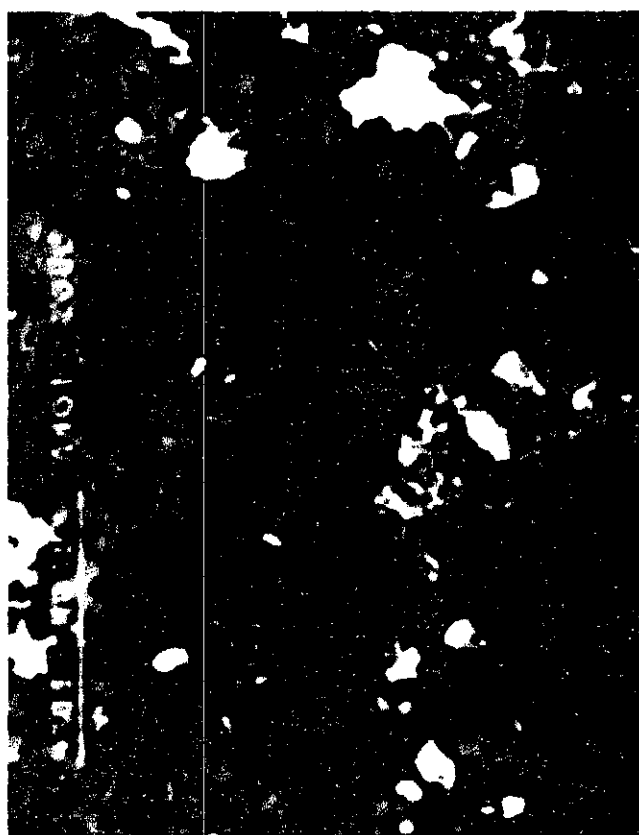
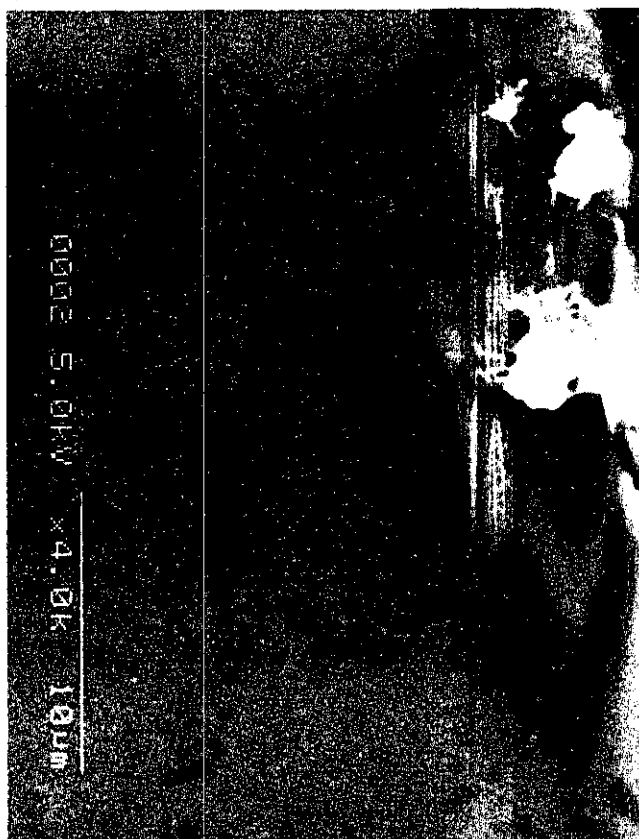
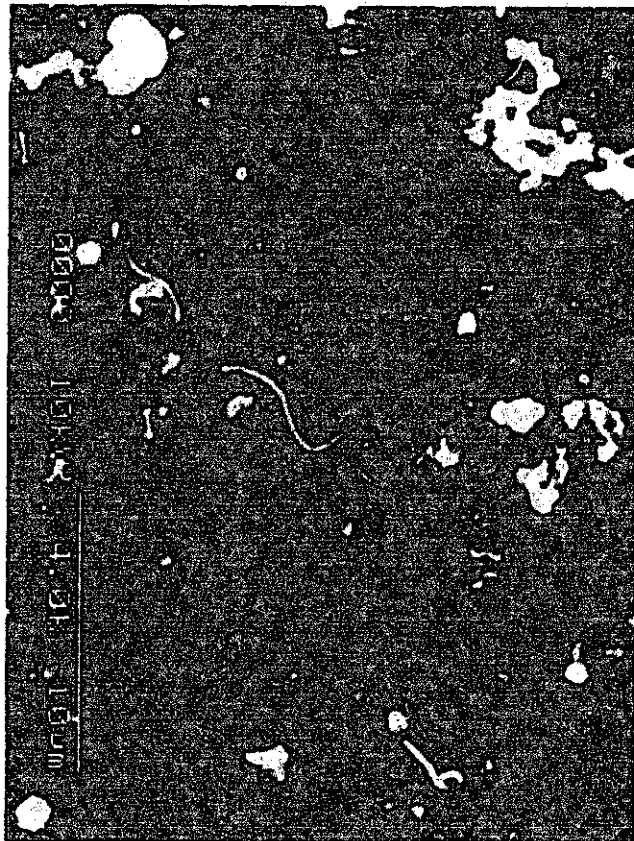


图 9



カーボンナノロッドは Toll-like receptor 2 を介してマクロファージを活性化する

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 柴田 健一郎、安田元昭 (北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座)

カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブが生体にどのような影響を及ぼすかを明らかにするための第一段階として、ヒト由来マクロファージ系細胞株である THP-1 細胞に及ぼす影響について調べた。カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブは共に THP-1 細胞を活性化し、TNF- α の産生を誘導した。THP-1 細胞活性化のメカニズムを明らかにするために、本細胞から微生物抗原の認識に関わる Toll-like receptor 2 (TLR2) をクローニングし、NF- κ B 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に遺伝子導入し、NF- κ B の活性化を調べた。その結果、カーボンナノロッドは TLR2 を介して NF- κ B を活性化した。

A. 研究目的

リポ多糖体、リポタンパク質、ペプチドグリカンなどの微生物由来物質はマクロファージや樹上細胞表面に発現している Toll-like receptor (TLR) で認識され、炎症性サイトカインなどの産生を誘導し、免疫系を活性化する(1, 2)。本研究では、我々はカーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブも異物として自然免疫系で認識されるのではないかと考え、まず、マクロファージで認識されるかどうかを調べた。

B. 研究方法

1. カーボンナノロッド及びカーボンナノチューブの分散・可溶化処理手順

1) 80°C で良く乾燥した多層カーボンナノチューブ (Nano Lab 社) 又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る。約 40 ml 過塩素酸水溶液を加え、90°C の恒温槽で一晩中放置する(金属触媒を始め、他の不純成分の酸化・除去)。

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又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又はカーボンナノチューブを洗浄する。洗浄液としては、それぞれ、脱イオン水、50% アセトニトリル、脱イオン水である。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%過酸化水素で洗浄する(殺菌)。

5) フィルター(通過孔直径、100 nm)上に堆積したカーボンナノロッド又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、超音波を掛け、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)。

2. カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブによる単球系細胞株(THP-1 細胞)の活性化

U 型の 96 穴のマイクロプレートを用いて、その 1 ウェルに 10% human serum を含む RPMI 1640 培地 200 μ l 中に 5×10^5 個の THP-1 細胞を懸濁させ、カーボンナノロッド(原液 2 ppm)ならびにカーボンナノチューブ懸濁液(原液 0.1 ppm)の原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液の 10 μ l で 16 時間刺

激した。遠心により上清を集め、ELISA 法で TNF- α 量を測定した。

3. カーボンナノロッドの TLR2 による認識

THP-1 細胞から、ヒトの TLR2 遺伝子を RT-PCR 法により pEF6/V5-His TOPO (Invitrogen 社) ベクターにクローニングした(以後 TOPO-TLR2)。

TOPO-TLR2 遺伝子を NF- κ B 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子(pNF- κ B luciferase reporter plasmid)とともに human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に遺伝子導入し、0.01 ならびに 0.1 ppm のカーボンナノロッドで 6 時間刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. TLR2 の発現ならびに TNF- α の測定

TLR2 のタンパク分子の発現は Flow cytometry ならびに Western blotting で、また、mRNA の発現は RT-PCR で測定した。

C. 研究結果ならびに考察

THP-1 細胞を、カーボンナノロッド浮遊液(最終濃度 0.1、0.01 ならびに 0.001 ppm)ならびにカーボンナノチューブ(最終濃度 5、0.5 ならびに 0.05 ppb)で刺激した。いずれも、THP-1 細胞を活性化して、濃度依存的に TNF- α 産生を誘導した(図1, 2)。カーボンナノチューブはカーボンナノロッドの約 1/20 の濃度で約 3 倍高い濃度の TNF- α 産生を誘導した(図1, 2)。言い換えれば、カーボンナノチューブはカーボンナノロッドより約 60 倍強いマクロファージ活性化能を有していることがわかった。

THP-1 細胞は TLR2 を介してペプチドグリカン、リポタンパク質、リポペプチドなどの微生物由来の pathgen-associated molecular pattern (PAMP)を認識し、活性化され、TNF- α を産生することが明らかにされている。したがって、我々はカーボンナノチューブならびにカーボンナノロッドも TLR2 を介して THP-1 細胞を活性化しているのではないかと推測した。そこ

で、まず、THP-1 細胞に TLR2 の mRNA ならびにタンパク分子が発現しているかどうかを RT-PCR ならびに Flow cytometry により測定した。その結果、THP-1 細胞は TLR2 の mRNA ならびにタンパク分子を発現していることがわかった(図3)。次に、THP-1 細胞から TLR2 遺伝子をクローニングし、HEK 293 細胞に遺伝子導入し、その発現を Western blotting 法により測定したところ、TLR2 分子は発現していることが確認された(図4)。そこで、NF- κ B 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに TLR2 遺伝子導入した HEK293-TLR2 細胞を 0.1 ならびに 0.01 ppm で刺激した。その結果、濃度依存的な NF- κ B レポーター活性が検出された(図5)。このことはカーボンナノロッドが TLR2 で認識され、NF- κ B が活性化されることを示唆している。

以上の結果から、カーボンナノロッドによる THP-1 細胞の活性化は、TLR2 を介してシグナルが細胞内に伝達され、転写因子 NF- κ B が活性化され、TNF- α が産生されたものと推測される。また、TLR2 がペプチドグリカン、リポタンパク質、リポペプチドなどの PAMP 以外にも、カーボンナノロッドなどの生体存在しない異物を認識するという本実験結果は TLR の生体防御における新たな一面を明らかにしている点で非常に興味深い。また、カーボンナノチューブが HEK293-TLR2 細胞を活性化するかどうかについて現在検討中である。

文献

1. Akira S., Takeda, K., and Kaisho T. Toll-like receptor: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675-680, 2001.
2. Aderem, A., and Ulevitch, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787, 2000.

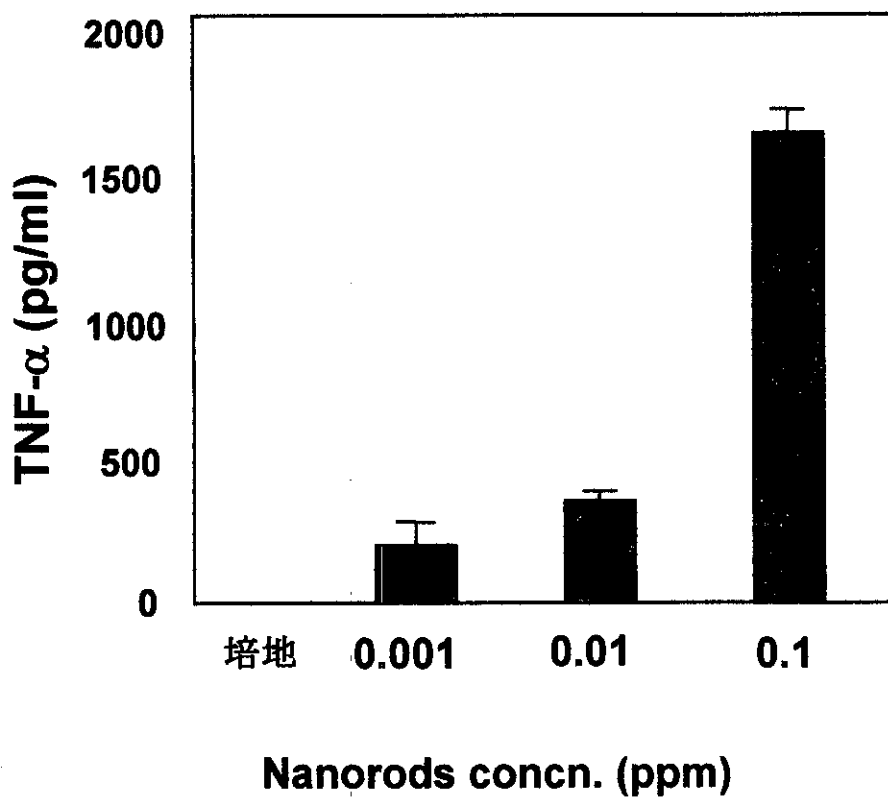


図1. ナノロッドによるTHP-1細胞の活性化

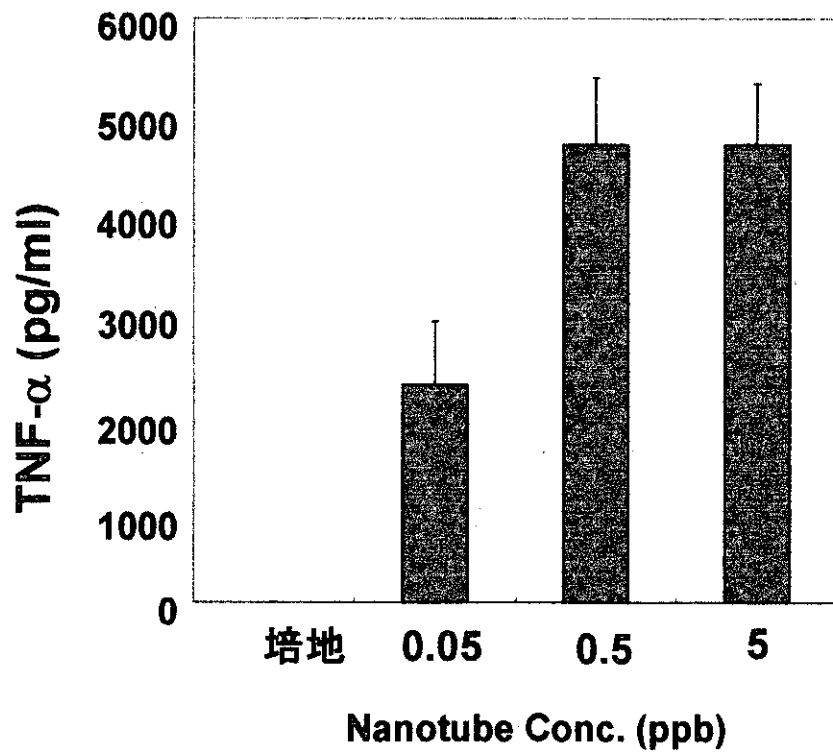


図2. ナノチューブによるTHP-1細胞の活性化

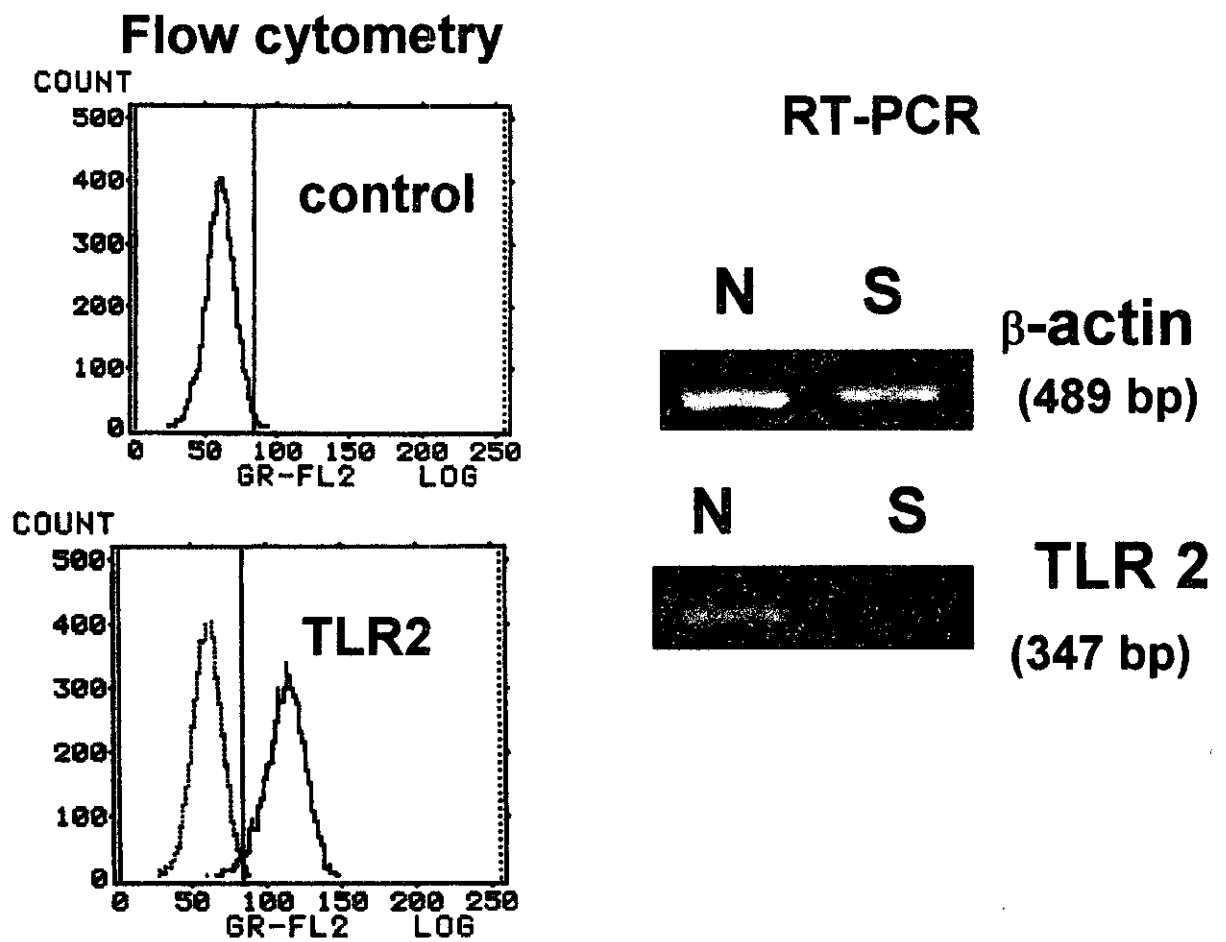


図3 THP-1 細胞におけるTLR 2 のタンパク分子ならびにmRNAの発現

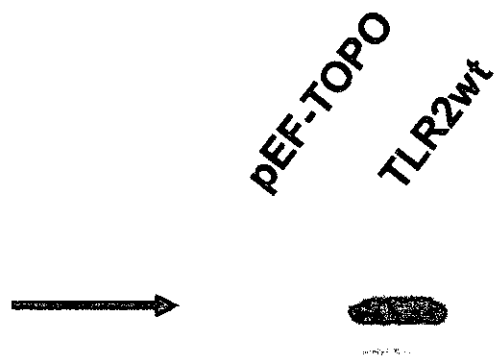


図4. HEK 293 transfectantsにおけるTLR2 の発現

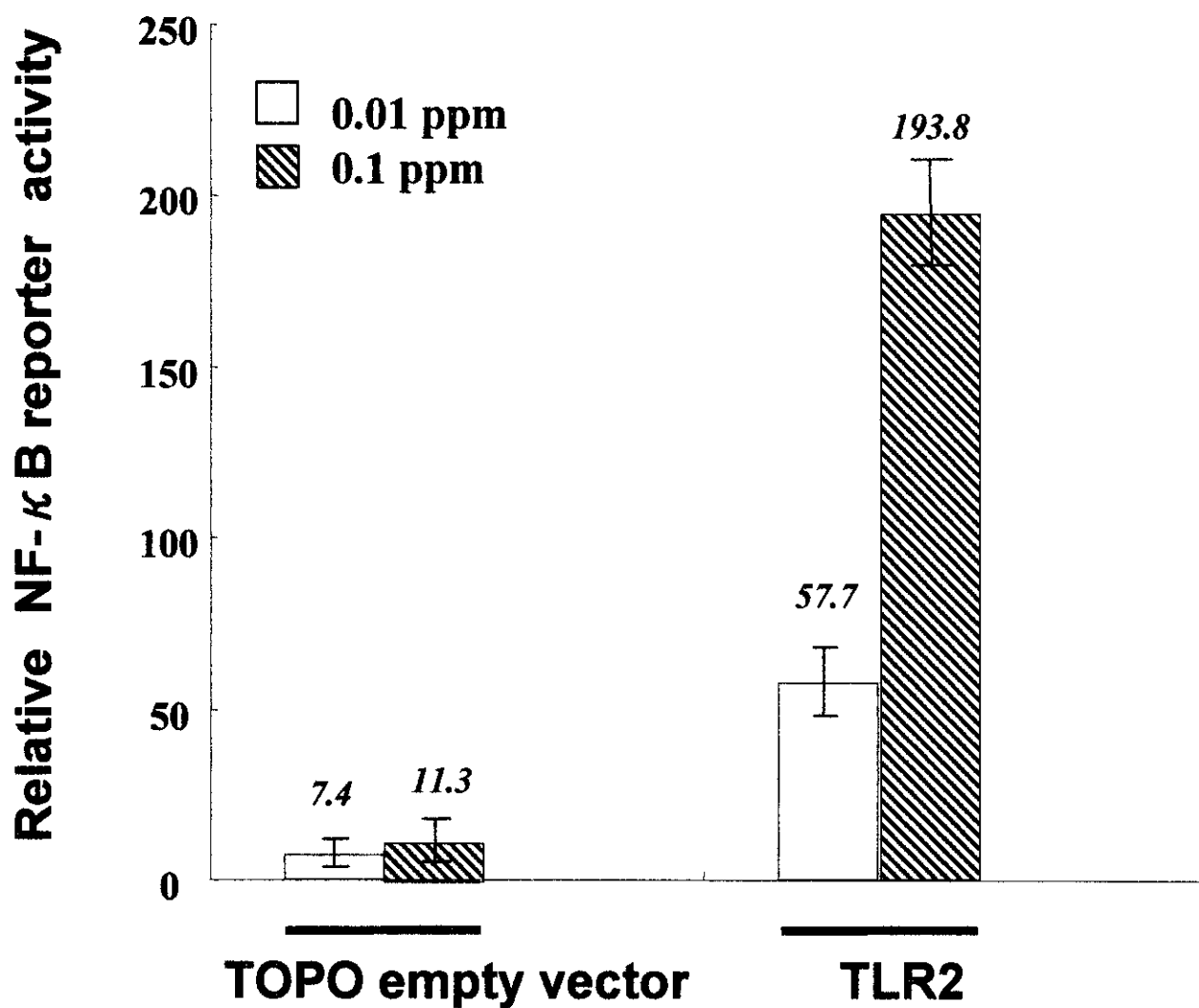


図5. TLR2 を導入したHEK293 細胞のカーボンナノロッドによる活性化

水懸濁分散化カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブ の骨芽細胞培養系における作用

主任研究者 亙理文夫 北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者 田村正人 北海道大学大学院歯学研究科教授

研究要旨 カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブの哺乳動物細胞に対する作用とその作用メカニズムを明らかにする目的で、水に懸濁させ分散化したカーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブを樹立された骨芽細胞様細胞に添加して培養を行い細胞培養系における細胞の増殖と機能に対する影響について検討した。MC3T3-E1 細胞において水分散化ナノロッドを添加後 4 8 時間後の生細胞数は、添加した水分散化ナノロッドの濃度に依存して減少した。しかし、MG-63 細胞においては、添加した水分散化ナノロッドの濃度に依存して増加した。また、水分散化ナノロッドを加え 1 週間培養後の MC3T3-E1 細胞のアルカリフォスファターゼ活性は、加えたナノロッドの量が増えるにしたがって低下した。以上の結果から、水分散化ナノロッドは細胞培養系においては、その作用機構は不明であるが、細胞の種類に応じた生理活性を有する可能性が示唆されるものと考えられた。

A. 研究目的

従来からグラファイト、ダイヤモンド、無定形炭素の 3 つが炭素からなる同位体として知られている。しかし、近年 C60 フラーレンと呼ばれるサッカーボール状分子をはじめとした高次のフラレンが次々と発見されてきた。また、筒状のナノスケール分子としてカーボンナノチューブが見出された。生体を構成する元素としては、炭素、酸素、水素、窒素、カルシウム、リンが主な元素であり、炭素は人体の構成元素組成の 50% を占める主要な元素成分である。本研究では、この炭素元素より成るカーボンナノチューブの生体への応用へ向けカーボンナノチューブの生体に関する作用とそのメカニズムを明らかにすることによって、その分子基盤を確立させることを研究の目標とした。

本研究では、カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブの哺乳動物細胞に対する作用とその作用メカニズムを明らかにする目的で、水懸濁分散化カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブを樹立された哺乳動物の骨芽細胞様細胞に添加して培養を行い、哺乳動物細胞培養系における細胞の増殖と機能に対する影響について検討した。

B. 研究方法

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞（理化学研究所細胞バンクより入手）ならびにヒト骨肉腫由来細胞株である MG-63 細胞（理化学研究所細胞バンクより入手）を、10%ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum; FBS）を加えた α -MEM 培地（Sigma 社）にて 5%CO₂, 95%Air の条件下にて直径 100mm の細胞培養用プラスチック dish（falcon 社）で培養を行った。この細胞を、0.125%

トリプシン, 0.5%EDTA 溶液 (Sigma 社) を用い dish より剥離させ, 1×10^5 /ml の濃度で 24-well 細胞培養用プラスチック dish (falcon 社) に再度播種し, 2 4 時間後に種々の量の水懸濁分散化カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブを培地中に添加し, 引き続き培養を行った。

水懸濁分散化カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブの作製は下記の方法によって行った。

1. 80°Cで良く乾燥したカーボンナノチューブ、又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た。約 40ml の過塩素酸水溶液を加え, 90°Cの恒温槽で一晩中放置し, 金属触媒を始め、他の不純成分の酸化・除去した。

2. 炭酸ナトリウムを加え, 残留した過塩素酸を中和した。この際に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である CHAPS を加え, CHAPS の濃度が約 30 mM になるように調整した。これは, カーボンナノロッド又はカーボンナノチューブの分散を更に良くするために行ったものである。

4. LIPEX™ EXTRUDER を使って, カーボンナノロッド又はカーボンナノチューブを洗浄した。洗浄液としては, それぞれ, 脱イオン水, 50%アセトニトリル, 脱イオン水を使用した。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%過酸化水素で殺菌のため洗浄した。

5. フィルター(通過孔直径, 100 nm)上に堆積したカーボンナノロッドもしくはカーボンナノチューブ(MW タイプ)をピーカーに移し, 脱イオン水を加えた後, 超音波を掛け, 脱イオン水に分散させた。

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)原液の濃度は約 0.1 ppm であった。

哺乳細胞の増殖に対する効果を調べるために, 4 8 時間後に生細胞数を MTT 法によって測定した。MTT 法は, MTT3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide が細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素の基質であり, 生存能の高い細胞ほど還元される MTT 量が多く, その結果生じるホルマザン量が生存細胞数とよく対応するため生細胞のみを測定する方法として用いられている。本研究においては, MTT 溶液を各ウェルに 10 μ l ずつ添加し, 570 nm の吸光度測定を行った。

また, 細胞の機能に対する影響について, 骨芽細胞の細胞膜上に存在するリン酸加水分解酵素であるアルカリフォスファターゼ活性を, 活性染色法を用いて測定した。活性染色法は bromo chloro indolylphosphate (BCIP) ならびに nitroblue tetrazolium (NBT) を使用した。

C. 研究結果

(1) 水懸濁分散化カーボンナノロッド

MC3T3-E1 細胞において水懸濁分散化カーボンナノロッドを添加後 4 8 時間後の生細胞数は, 添加した水懸濁分散化カーボンナノロッドの濃度に依存して減少した(図 1)。しかし, MG-63 細胞においては, 添加した水懸濁分散化カーボンナノロッドの濃度に依存して増加した(図 2)。また, 水懸濁分散化カーボンナノロッドを加え 1 週間培養後の MC3T3-E1 細胞のアルカリフォスファターゼ活性は, 加えたカーボンナノロッドの量が増えるにしたがって低下した(図 3)。

(2) 水懸濁分散化カーボンナノチューブ

MC3T3-E1 細胞において、水懸濁分散化カーボンナノチューブ(MW タイプ)を添加して培養し、1週間後のアルカリフォスファターゼ染色を行った。カーボンナノチューブの量に応じて、染色が低下し、酵素活性の低下が明らかとなった。

D. 考察

本研究で得られた結果から、本研究で使用した水懸濁分散化カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブは、骨芽細胞様細胞の細胞培養系においては、増殖促進、抑制といった相反した生理活性を有している可能性が示唆された。細胞増殖に対する作用が一体どのような作用メカニズムによるものかは今後の研究課題である。本研究で使用したカーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブは、水懸濁状態で水に対して分散化させているが、水にどれだけ可溶性が明らかではない。水に分散しただけの分子は、細胞にとって明らかに異物として認識され、細胞の異物認識機構によりエンドサトーシスによって細胞に取り込まれる可能性が考えられる。細胞増殖や細胞に対する機能が、これらエンドサトーシスによってどのように修飾されるか、またその修飾に細胞特異性が存在するのか、といった問題に対する解答は未だ不明である。

炭素分子のみからなり、極性を有さない分子であるカーボンナノチューブはもともと分子構造上は Bio inactive な性質を有すると考えられてきた。本研究で用いたカーボンナノチューブ・ナノロッドの水懸濁分散化の過程において、何らかの分子修飾を経て、細胞への機能性が付与されたのか、

もしくはカーボンナノチューブの単なる不溶性分子としての性格による生理機能のいずれであるかを明らかにしていく必要があると考えられた。

E. 結論

水分散化カーボンナノロッド・カーボンナノチューブは細胞培養系においては、その作用機構は不明であるが、細胞の種類に応じた生理活性を有する可能性が示唆されるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 学会発表

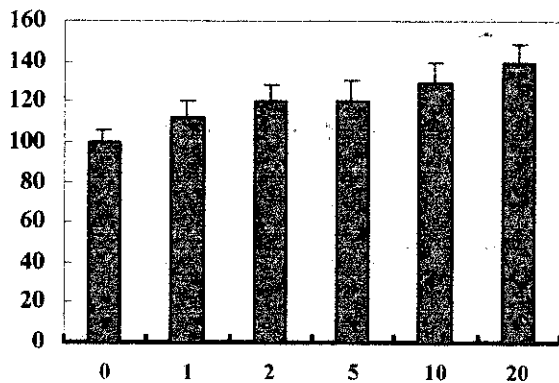
田村正人, 骨の細胞の分化と機能, ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用平成14年度第1回目標策定研究発表会, 平成14年9月9日, 北海道赤井川村

田村正人, 田路和幸, 古月文志, 鈴木豊典, 戸塚靖則, 可溶化ナノロッドの骨芽細胞培養系における作用 ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用平成14年度第2回研究発表会, 平成15年2月17日, 岐阜

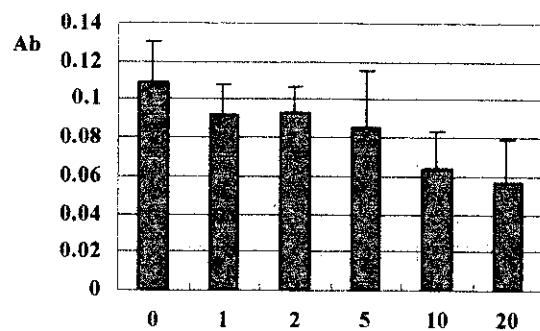
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

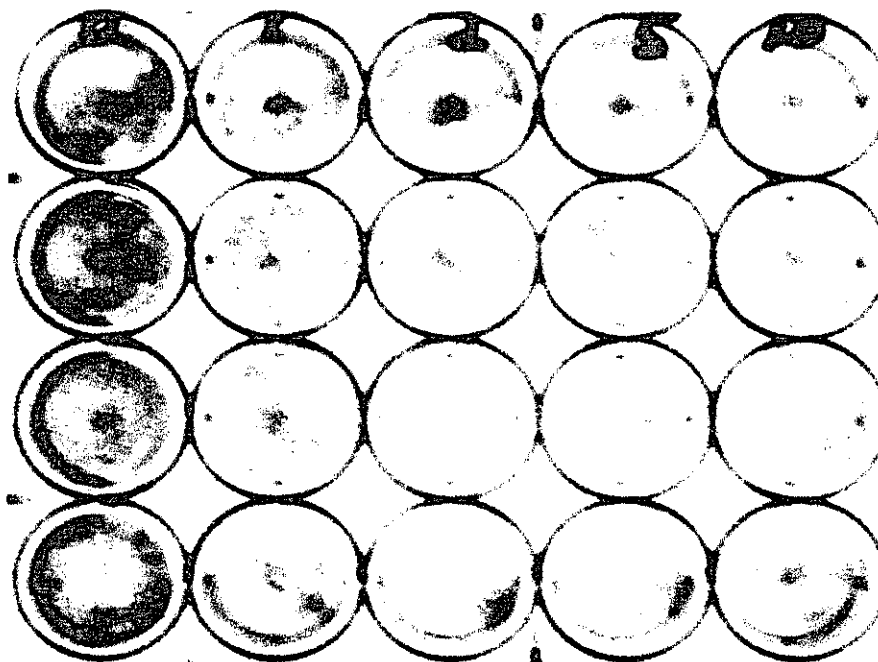
- ☒ 1 Cell Number of MG-63 cells in a presence of soluble carbon nanorod in cultures
- ☒ 2 Cell Number of MC3T3-E1 cells in a presence of soluble carbon nanorod in cultures
- ☒ 3 Alkaline phosphatase activities of MC3T3-E1 cells in the presence of soluble carbon nanorod in cultures



☒ 1



☒ 2



☒ 3