

CNTを支持体としたDNAの高分解能電顕観察

分担研究者 亘理文夫 北海道大学歯学研究科教授

研究協力者 矢田慶治 東北大学・名誉教授

高橋 元 弘前大学医学部保健学科

本研究では、極めて細く電子線にも強いCNTを適当な濃度で分散させて網渡しを作り、それをDNA繊維の支持体にすることを試みた。

A. 研究目的

本研究等者は、数年前から精製した牛の胸腺DNAの高分解能電顕観察を行ってきた。方法としては 10^{-4} 程度に薄めた懸濁液を作り、その1滴をマイクログリッド上で凍結乾燥させ、マイクログリッドの孔に支持膜なしに差し渡しになっているDNA繊維を観察するのであるが、高分解能観察に必要な強度の電子線照射でも切れないで一本のDNA繊維を観察するには繊維の長さが $0.1\mu\text{m}$ 以下であることが必要で、従ってマイクログリッドの孔も $0.1\mu\text{m}$ 程度のものが必要であることが分かった。種々の試みを行った結果を国際電顕学会で報告したが[1]、満足すべきマイクログリッドの製作には未だ成功していない。本研究では、極めて細く電子線にも強いCNTを適当な濃度で分散させて網渡しを作り、それをDNA繊維の支持体にすることを試みた。

C1. 研究成果

実験に用いたCNTは日機装KKの八名氏から恵与を受けたmulti-layerの比較的太いもので、これをコロチオン溶液に入れて分散させ水面上に落として薄膜状に広げ、メッシュに掬い上げてからコロチオンを溶解除去する方法を採った。具体的には6mgのCNTを2.5%のコロチオン2ccに入

れ、細胞破碎用の超音波機で時間を変えてソニケーションを行った。結果として約10分でよく分散した。それを放置すると凝集する傾向が見られたが、まだ分散しているうちにその $20\mu\text{l}$ を水面に落とした。その広がり方は水の温度でコントロールでき、高温ほど広がり方は少ない。約 50°C の温湯上に落としてカーボンで補強したマイクログリッドで掬い上げたときの電顕写真を図1に示す。かなり良く分散していて長さの短くなったものが多いことが分かる。この試料を酢酸アミルに入れるとコロチオン膜は溶解除去できる。ただし目的の支持体としてはもう少し繊維の濃度を増やしてやることが望ましい。また、放置すると凝集することに関しては、表面活性剤を加えることで防げるであろう。

実際にこのCNTの網にDNA繊維を載せる実験はこれからであるが、以前に行った手順を図2に示す[1]。図3は、その折りに得られたDNA単繊維像の1例を示す。今後、電顕像の像質を更に上げるつもりである。

文献[1] K.Yada and G.Takahasi, Proc.14th ICEM, Cancun Mexico(1998), Sympo.AA vol.2 pp841-842



図1.コロチオン溶液に入れたCNT を数分間細胞破碎用超音波にかけ、水面上に滴下した時の分散状態。

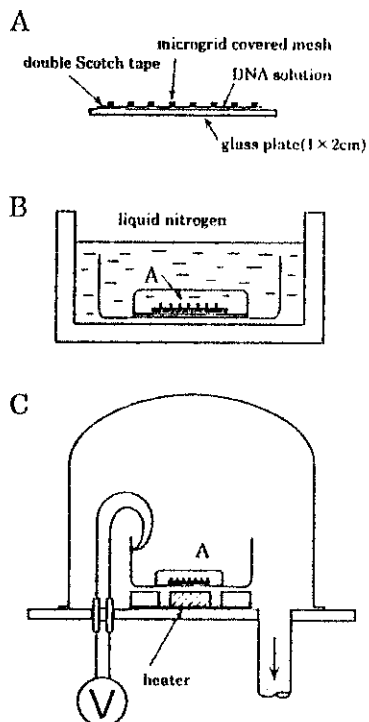


図2. 凍結乾燥法でCNT単繊維サンプルを作る方法の模式図



図3. DNA単繊維の像の1例

分担研究報告書

バイオ応用を目指したカーボンナノチューブの合成、高純度精製、サイズ制御、及び水溶化フラーレンに関する研究

分担研究者 田路和幸 東北大学大学院工学研究科地球工学専攻 教授

研究要旨 本研究班では、ナノスペースを持つフラーレン、カーボンナノチューブなどの特異形状炭素物質を生体材料（臓器）、HIV、癌治療、遺伝子治療のベクターとして応用するために、フラーレン、カーボンナノチューブの合成、精製を行う。さらに、精製された炭素材料を生体実験に適したサイズに制御し、水溶化することが目的である。本研究では、単層ナノチューブ、多層ナノチューブなどのナノスペースを持つ炭素材料をアーク放電法により合成を行い、湿式粉碎、湿式酸化、水熱処理、遠心分離、燃焼酸化などの処理を組み合わせることによって、カーボンナノチューブの高純度精製に成功した。また、ナノチューブの切断技術を検討し、高回転ホモジナイザーによってカーボンナノチューブが切断されることを確認した。一方、水に不溶であるフラーレンをオゾン酸化、アルカリ溶液処理による方法を用いて、水溶化フラーレンを容易に合成することに成功した。

1. カーボンナノチューブ合成法の開発

A. 研究目的

フラーレン、カーボンナノチューブは、「グラフェンシートが籠状に閉じた構造」を持つ新たな炭素物質である。これらの物質の特徴は、グラファイトやダイヤモンドには存在しないナノスペースを持つことである。フラーレン（Fullerenes）は球状であり、カーボンナノチューブ（Carbon Nanotubes; CNTs）は、グラフェンシートで構成された繋ぎ目のないチューブ状の物質である。特にカーボンナノチューブは、一枚のグラフェンシートで構成される単層カーボンナノチューブ（Single-Walled Carbon Nanotubes; SWCNTs）、複数のグラフェンシート

で構成される多層カーボンナノチューブ（Multi-Walled Carbon Nanotubes; MWCNTs）がある。CNTs は直径、カイラリティの基本構造から由来する電子物性と、長さ、形などの形状から由来する機械特性、吸着特性を組み合わせることによって、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。

フラーレン、カーボンナノチューブは、「分子や元素が入る空間」がある。これらのナノスペースを利用して、フラーレンやカーボンナノチューブは、バイオナノテクノロジーに応用される可能性がある。例えば、中空に造影剤元素が入れられたフラーレンは、従来のMRIの造影剤以上の感度で診断できる造影剤と期待されている。カーボンナノチューブは、中空を利用した「薬剤の生体内輸送と放出」などのバイオメデ

イシンとしての応用が検討されている。したがって、フラーレン、ナノチューブに見られる様々なナノスペースを持った炭素物質のバイオテクノロジーは、今後の医療技術において有効な手段になりうる。本研究では、バイオテクノロジーにカーボンナノチューブを応用するために、様々なナノスペース形態をもつカーボンナノチューブの合成を行った。

B. 研究方法

-高速道路型 SWCNTs の合成-

高速道路型 SWCNTs の合成は、触媒金属として Fe/Ni を用いたグラファイトロッドのアーカ放電によって行った。この触媒による SWCNTs は直径が約 1.0 nm、長さ数 μm と非常に長く互いに絡み合った高速道路のような形態を持つ。この触媒で合成されたススは、SWCNTs の含有量が多く、チャンバー内壁にシート状に堆積する。アーカ放電では、陰極には直径 10 mm のグラファイトロッドを、陽極には Fe/Ni 金属の濃度が約 5.0 atm.% の直径 6 mm のグラファイト棒を用いた。合成手順を以下に示す。

- ① 電極を取り付けた装置内をロータリーポンプで 1 Pa まで真空引きする。
- ② 脱気を続けながら両電極を接触させ、100 A の直流電流を 7 分間流し、陽極に詰めた粉末をグラファイトの抵抗加熱によって焼結させる。
- ③ 装置をしばらく放置し冷却させた後、チャンバー内に He ガスを 100 torr まで満たし、70 A でアーカ放電を行う。放電中は電極間の距離を約 5 mm に保持する。
- ④ 装置をしばらく放置し冷却させた後、煤を回収する。

-ウニ型 SWCNTs の合成-

ウニ型 SWCNTs は、直径が約 1.5–2.0 nm、

長さ数 50–100 nm が金属触媒から放射状に突き出た形態をもっている。ウニ型 SWCNTs は、チャンバー内壁に堆積したススに含まれる。ウニ型 SWCNTs の合成は、炭素に対して 1.7 atm.% の Ce 金属を含んだグラファイトロッドのアーカ放電によって行った。以下に合成手順を以下に示す。

- ① 電極を取り付けた装置内をロータリーポンプで 1 Pa まで真空引きする。
- ② 脱気を続けながら両電極を接触させ、80 A の直流電流を 15 分間流し、陽極に詰めた粉末をグラファイトの抵抗加熱によって焼結させる。
- ③ 装置をしばらく放置し冷却させた後、チャンバー内に He ガスを 500 torr まで満たし、75 A でアーカ放電を行う。放電中は電極間の距離を約 5 mm に保持する。
- ④ 装置をしばらく放置し冷却させた後、煤を回収する。

-MWCNTs の合成-

MWCNTs は直流アーカ放電法によって合成した。MWCNTs は陰極堆積物中の柔らかい黒色の針状物質に含まれる。陰電極には直径 40 mm、厚さ 15 mm のグラファイトプレートを、陽電極には直径 10 mm のグラファイト棒を用いた。以下に MWCNTs の合成方法を述べる。

- ① チェンバーを 1 Pa まで真空引きし、炭素棒を接触させ、150 A の直流で 5 分間ベーキングを行い、炭素棒の不純物を飛ばす。その後、もう一度真空引きを行い、He ガスで 350 torr に満たす。
- ② He ガスを満たした後、直流電流 100 A、電圧 17.5 V、電極間 1 mm に保ちながらアーカ放電を行い、陰極堆積物を合成する。

③ 合成された陰極堆積物を半分に割り、中に
ある柔らかい針状物質を取り出す。

カーボンナノチューブの生成状況は、日立
S-4100 走査形電子顕微鏡 (SEM)、日立 HF-2000
透過形電子顕微鏡 (TEM) により評価した。

C. 研究結果

図 1-1 に高速道路型 SWCNTs を合成したススの
SEM 像を示す。合成されたマット状のスス
中に繊維状物質が確認された。また、粒子状の
副生成物も多数存在していることが分かった。

図 1-2 に高速道路型 SWCNTs を合成したススの
TEM 像を示す。繊維状物質は高速道路型
SWCNTs の形態を持つことを確認した。
SWCNT の 1 本 1 本が独立で存在せず、数本が
寄り集まって束になって生成していた。副生成
物の微粒子は、金属微粒子、金属を内包したグ
ラファイトカプセル、グラファイト、アモルファ
スカーボンであることを確認した。

図 1-3 は、ウニ型 SWCNTs ススの SEM 像であ
る。丸い微粒子の集合体が観察され、この微粒子
がウニ型 SWCNTs であると考えられる。図 1-4 にウ
ニ型 SWCNTs ススの TEM 像を示した。チューブ
は 1 本ではなく、5-6 本から構成される束状で伸び
ており、その長さは 50nm から 100nm と高速道路型
SWCNTs と比べて非常に短かった。チューブの直
径は 1.4nm から最大直径 2.2nm まで観察され、先
端は閉管していた。ウニ型 SWCNTs はセリウム炭
化物から短い SWCNTs が伸びている形状のもの
と、セリウム炭化物から SWCNTs が伸びずに、チュー
ブが寄り集まって、花びらのような形状のもの(図
1-5)と 2 通りのものが合成されていた。

合成された陰極堆積物の概観は陽極炭素棒と
同程度の直径を持った長さ 20mm の円柱状であ
った。周辺部分は金属光沢をした黒鉛で、中心
部分は黒色の針状黒鉛物質が筋状に成長してい
た。黒色の針状黒鉛物質の SEM 像を図 1-6 に示
す。この部分は崩れやすく、その表面に繊維状
物質の合成が確認できた。また、繊維物質の他

にナノからマイクロオーダーの副生成物が合成
されており、繊維物質は副生成物と絡まって合
成されている部分も確認できた。図 1-7 は陰極
堆積物中の MWNTs の TEM 像である。繊維物
質はグラフェンシートが幾層にも重なった
MWCNTs であることを確認した。MWCNTs の
形態は、外径 20-40 nm、内径 1.5-5 nm で、
長さは数 μ -数十 μ m で直線状であった。その
他の副生成物は、主にグラファイト、グラファ
イトカプセルであることがわかった。

D. 考察

本研究で使用したアーク放電法は、触媒金属
を使うことで SWCNTs が合成できることを確
認した。触媒金属の種類を替えることによって
高速道路型 SWCNTs やウニ型 SWCNTs などの
ように直径や長さの異なる SWCNTs、すなわち
異なるナノスペースを持つチューブを合成でき
た。図 1-2、図 1-4 にも示されているように、
SWCNT 1 本 1 本は約 1 nm の直径を持つチュー
ブである。1 本の比表面積は非常に大きく、表
面エネルギーが大きいいため、1 本独立では存在
できず、束状になって安定化していると考えら
れる。一方、金属触媒ないアーク放電では、陰
極堆積物の中に MWCNTs を合成できることを
確認した。このようにアーク放電法は、様々な
炭素物質を合成でき、生体応用に可能な特異な
構造をもつ炭素材料を合成する有効手段の一つ
であると思われる。

E. 結論

ナノスペースを持つ様々な炭素物質をバイオ
テクノロジーに応用するために、アーク放電法
を用いて「高速道路型 SWCNTs」、「ウニ型
SWCNTs」、「MWCNTs」などの様々な形態を所
有するカーボンナノチューブの合成技術を確立
した。

2. 高速道路型 SWCNTs の高純度精製技術の開発

A. 研究目的

アーク放電法で合成された高速道路型 SWCNTs 含むススには、アモルファスカーボン、カーボンナノカプセル、グラファイト、金属微粒子などの副生成物が存在する。したがって、生体に SWCNTs を応用するためには、これらの副生成物を除去してやらなければならない。本研究では、湿式酸化、沈降分離、酸処理を行うことによって、アモルファスカーボン、グラファイトカプセル、グラファイト、金属微粒子を除去し、SWCNTs の高純度精製を試みる。

B. 研究方法

本実験では、アーク放電法によって合成した高速道路型 SWCNTs を含むススを精製出発物として用いた。陰極には直径 10 mm のグラファイトロッドを、陽極には Fe/Ni 金属の濃度が約 5.0 atm.% の直径 6 mm のグラファイト棒を用いた。アーク放電は He ガス 100 torr、放電電流 70 A で行った。

この合成したサンプルに対して、次に示す処理を行った。

1. 還流装置を用い、サンプル 1g を 20% の過酸化水素水 750 mL に入れ、100°C で 6 時間加熱し、スス中のアモルファスカーボンを湿式酸化させる。
2. 残ったススを蒸留水中で超音波照射を行い、均一分散させ、沈降分離を行う。この段階でナノカプセルやグラファイトを除去する。
3. その後、約 6M の HCl でススを洗い、金属微粒子を溶解し除去する。

SWCNTs の精製状況は、日立 S-4100 走査形電子顕微鏡 (SEM)、日立 HF-2000 透過形電子顕微鏡 (TEM)、Jobin-Yvon T64000 ラマン散乱分光測定器により評価した。

C. 研究結果

本実験に使用した高速道路型 SWCNTs ススの SEM 像を図 2-1 に示す。アーク放電法によって合成されたススには、SWCNTs の他に様々な副生成物が存在している。このススに対して、20% の過酸化水素水で 6 時間還流を行ったススの SEM 像を図 2-2 に示す。図 2-1 と比較すると、SWCNTs の表面に付着している不純物が取り除かれ、SWCNTs の輪郭が鮮明に観察される。これは過酸化水素水により、スス中のアモルファスカーボンが酸化されたことを示している。また、ラマン測定からも SWCNTs の濃度が高くなっていることを確認した。

次に沈降分離を行い、さらに酸処理を行った後のススの SEM 像と TEM 像をそれぞれ図 2-3、2-4 に示す。これらの図から、スス中の不純物がほぼ取り除かれ、SWCNTs が精製されたことが分かる。精製された SWCNTs の表面には不純物が少なく、綺麗な表面であった。

D. 考察

大気雰囲気中、オープンによって、SWCNTs を取り囲んでいるアモルファスカーボンを燃焼酸化させる方法では、大量のアモルファスカーボンを均一に燃やすことが困難である。困難である原因は、試料全体に熱が均一に加わらないことと、酸素分子が試料内に拡散しにくく、表面だけが燃焼酸化されることによる。本精製法は、過酸化水素水中で均一に SWCNTs ススを分散させて、満遍なく大量のアモルファスカーボンを酸化させることができる。これによって、大量の試料を精製でき、SWCNTs の精製方法がスケールアップできることを示唆している。また、過酸化水素の濃度を変えることによって、酸化速度を制御できるメリットもあると考えられる。

E. 結論

本研究では、高速道路型 SWCNTs を生体に応用するために、湿式酸化、沈降分離、酸処理を行って高速道路型 SWCNTs の高純度精製を試

みた。湿式酸化処理を行うことによって、スス中の大量にあるアモルファスカーボンを一に酸化・除去することができた。このウェットプロセスによって、大量の高速道路型 SWCNTs が高純度精製できることを確認した。

3. MWCNTs の高純度精製技術の開発

A. 研究目的

アーク放電法で合成される MWCNTs は陰極堆積物の中に合成されるが、副生成物としてグラファイト片やカーボンナノ粒子が多数合成される。MWCNTs を生体に応用するため、これらの副生成物を取り除き MWCNTs の精製することは必要不可欠である。これまでに MWCNTs の精製法は、酸化法、遠心分離法などがある。主に使われている精製方法は酸化法で、グラファイト片を MWCNTs からうまく分離していないため、グラファイト片を燃焼する間に、MWCNTs がどんどん燃焼し、短くなることが問題とされている。このような損失を防ぎ、MWCNTs の回収率を向上するためには MWCNTs とグラファイト片を分離することが非常に重要であると考えられる。本研究では、湿式粉碎、水熱処理、遠心分離、燃焼酸化を用いて、MWCNTs の大量精製技術を開発することを目的とした。

B. 研究方法

MWCNTs は直流アーク放電法によって合成した。陰電極には直径 40mm、厚さ 15mm のグラファイトプレートを、陽電極には直径 10mm のグラファイト棒を用いた。チャンバーを 1Pa まで真空引きし、炭素棒を接触させ、150A の直流で 5 分間ベーキングを行い、炭素棒の不純物を飛ばした。その後、もう一度真空引きを行い、He ガスで 350Torr に満たした。放電は直流電流 100A、電圧 17.5V、電極間 1mm に保ちながら陰極堆積物を合成した。合成された陰極堆積物を半分に割り、中にある柔らかい針状物質を取

り出し、それを精製の出発物とした。MWCNTs の精製手順を以下に示す。

1. 合成した陰極堆積物を半分にカットし、中にある針状堆積物を取り出す。
2. 針状堆積物は瑪瑙乳鉢で細かく粉碎し、蒸留水を数 mL 入れ、湿式粉碎を 1 時間行う。
3. 湿式粉碎物をフラスコに移し、1 時間超音波処理を行う。超音波後、 $37\mu\text{m}$ のフルイでろ過する。
4. 次に (3) のろ液を環流装置により、水熱処理を 12 時間行う。
5. その後、0.1 v/v% になるように界面活性剤を入れる。
6. 1 時間超音波照射し、チューブを分散させる。
7. 超音波分散させた分散液を 10000g、15 分間遠心分離、数 μm のグラファイト片を沈降させる。
8. 分散液を $0.1\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し、界面活性剤を洗い流すために、数回蒸留水でケーキをすすぐ。その後、ただちにケーキをエタノールに入った白金るつぽに入れ、分散させる。
9. 次に大気圧、 60°C でエタノールを蒸発させ、最後に大気圧、 750°C 、15 分間でカーボンナノ粒子を燃焼させる。

MWCNTs の精製状況は、日立 S-4100 走査形電子顕微鏡 (SEM)、日立 HF-2000 透過形電子顕微鏡 (TEM)、Jobin-Yvon T64000 ラマン散乱分光測定器により評価した。

C. 研究結果

合成された陰極堆積物をカットすると、中心部分は黒色の針状黒鉛物質が筋状に成長していた。この部分は崩れやすく、その表面に繊維物質が合成されていたことが確認できた。繊維物質の他にナノからマイクロオーダーの副生成物が合成されていた。図 3-1 は繊維物質の TEM 像で、MWCNTs であることが確かめられた。

図 3-2 は湿式粉碎後のポアサイズ $37\mu\text{m}$ のふる

いを通したろ液の SEM 像である。MWCNTs が濃縮され、チューブに 1-3 μm オーダーのグラファイト片、カーボンナノ粒子が付着していることがわかる。ケーキには、わずかに MWCNTs が観察されるが、ほとんどのものが数 10 μm 以上のグラファイト片の凝集体であった。

ふるいを通したろ液に水熱処理を施した試料には、カーボンナノ粒子、 μm オーダーのグラファイトが混在していた。水熱処理を施す前後で大きく違うところは、黒色物質がより水になじみ易くなり、分散性が良くなったことが挙げられる。また、TEM 像から、MWCNTs の先端の格子像がはっきりと観察され、MWCNTs の先端が水熱処理によって破壊されないことを確認した。

図 3-3 は遠心力 10000g で遠心分離した上澄みの TEM 像である。カーボンナノ粒子と MWCNTs がそれぞれ凝集している部分が多数観測された。MWCNTs に付着していたカーボンナノ粒子が脱離し、MWCNTs とナノ粒子がそれぞれ別に凝集したと考える。10000g の遠心分離により、MWCNTs と数 μm オーダーのグラファイトの分離が促進しており、数 μm オーダーのグラファイト片を分離することができた。

973K、大気中で 15 分間燃焼酸化した試料の SEM 像を図 3-4 に示す。カーボンナノ粒子がほぼ完全に燃焼酸化され、MWCNTs が高純度に精製されていることを確認した。図 3-5 は大気中、973K、15 分間燃焼させた試料の TEM 像である。この図からも、カーボンナノ粒子が取り除かれ、MWCNTs のみが得られていることが明らかである。MWCNTs の先端は燃焼酸化により、開いていることがわかる。

D. 考察

炭素材料の燃焼酸化は、炭素と酸素の発熱反応によって二酸化炭素が発生する反応である。炭素材料の形状によって燃焼酸化速度が変化する。すなわち、ナノサイズの炭素物質は比表面積が大きくなるため、炭素が酸素と反応する場が多くなるため、燃焼酸化速度も大きくなる。

この精製方法での重要な点は、燃焼酸化速度の遅い大きなグラファイトを取り除くことである。1 μm 以上の大きなグラファイトが混在する状態で燃焼酸化すると、グラファイトが酸化し終わった時に、すでに MWCNTs は燃えてなくなってしまう。すなわち、MWCNTs はグラファイトの燃焼酸化速度より速いことが分かった。したがって、燃焼酸化速度の遅い大きなグラファイトを取り除いた後に、比表面積の大きいカーボンナノ粒子を燃焼させ、高純度の MWCNTs が得られる。

一方、大きなグラファイトを取り除く際に、湿式粉碎を加えることで、多量の MWCNTs が大きいグラファイト片から効率よく分離され、MWCNTs の回収率を上げることができ、有効な手段であることを確認した。溶液中での粉碎は、回転によるせん断力が MWCNTs の絡んだグラファイト片に作用して分離する効果があると考えられる。

E. 結論

湿式粉碎、水熱処理を用いて精製し、MWCNTs の大量精製を目的とした。結果、この精製法を使うことにより、ほとんどのグラファイト片、アモルファスカーボン、カーボンナノ粒子を取り除き、高純度の MWCNTs を精製することができた。

4. カーボンナノチューブの長さ制御 —長さ制御の現状と攻略法—

A. 研究目的

これまでに CNTs は、電気物性、熱伝導性、吸着特性、機械的強度において優れた特性を示しており、SPM の探針、フラットパネルディスプレイの電子源、電池電極、センサー、ガス吸蔵媒体、複合強化材料など、広範囲の分野で応用研究が行われている。しかし、CNTs の中空を利用した「薬剤の生体内輸送と放出」などのバイオナノテクノロジーの応用はあまり進んでいない。その理由は、CNTs が長く、グラファ

イトの化学的性質に酷似しているため、CNTsの水溶化が困難であることによる。それゆえ、CNTsの長さを制御すること、すなわち短く切断することはCNTsの水溶化の第一段階であり、短いCNTsに置換基などを修飾することによりCNTsの水溶化が可能になり、生体分野の発展に大きな効果をもたらすと考える。したがって、第一段階の短いCNTsが如何に表面のきれいな素性の良いCNTsでなくてはならないことは言うまでもない。

CNTs 切断技術の現状

現在まで、CNTsの切断技術は5つの報告があり、それぞれの方法に長所、短所がある。

4-i STM 切断法 Au基板に分散させたSWCNTsとSTMチップの間にパルス電圧を印加させ、繰り返すことにより、チューブを切断する。チューブの切断したい場所を選ぶことが可能であるため、長さを揃えることが可能であるが、収率は非常に低い。

4-ii 強酸下における超音波処理法 CNTsを濃硫酸と濃硝酸の混液中で、50℃に保ちながら超音波照射を行う。強酸によるナノチューブネットワークの破壊と、超音波で生じる局所的な高温、高圧によるエネルギーを利用する。ナノチューブは切断されるが、壁が到る所で損傷しており、ナノチューブネットワークが壊れている。

4-iii フッ素化ナノチューブの加熱によるフッ化炭素脱離法 フッ素化させたSWCNTsを高温にすることによって、フッ素とナノチューブの炭素を CF_4 や COF_2 として分解させ、ナノチューブを短くする。最小20nmの長さまで短くすることができる。切断後のチューブはAFM、Ramanで観察されているが、Ramanスペクトルからは、Dバンドの増加、ブロードしたGバンドとRBMバンドが現れており、フッ素化したチューブが現存している可能性が強い。

4-iv ボールミリング粉砕法 SWCNTsを瑪瑙ポットに入れ、瑪瑙ボールでミリングする。

瑪瑙ボールの衝突エネルギーによってチューブを切断する。チューブの側面も破壊され、ナノチューブネットワークが壊れる。

4-v ナノメカニカルカット法 0.1 μm の粒径をもつダイヤモンド微粒子で覆われているディスクを2枚用意し、ダイヤモンド微粒子の面を少し隙間をあけて向かい合わせる。その隙間にSWCNTsを分散させたエタノールをしみ込ませ、溶媒が乾燥するまで機械的に擦り合わせる。この方法はダイヤモンド微粒子とナノチューブ衝突、せん断力を利用した機械的な切断である。得えられたSWCNTsはちぎれているが、ナノチューブの壁も損傷されている。

以上のように、切断処理する際にナノチューブの壁も損傷を受け、非常に表面状態の汚いチューブで得られるのが現状である。また、ナノチューブの切断は未処理ナノチューブのカーボンネットワークの完全性に大いに関係する。特に乱層構造をもつCVD法で合成されたMWCNTsは切断もされるが、壁の損傷も激しいので注意が必要である。

長さ制御の攻略法

上記の切断処理では、表面状態の非常に汚いチューブとなる。このようなチューブではナノチューブの利点を有効的に利用できない。我々は、綺麗な表面を維持したナノチューブの切断方法を目指し、高速回転分散器を用いたナノチューブの長さ制御を試みる。

(1) 高速回転分散器を用いたナノチューブの切断 回転翼と静翼をもつバッチ式の高速度回転分散器は、大きな回転速度により、処理対象物は分散ヘッドに軸流として自動的に吸引され、さらに回転翼、静翼装置のスロットを抜けて放射状の動きが加えられる。加速に伴い大きな力が加わるため、処理対象物には非常に大きなせん断力と推進力がかかる(図4-1)。ナノチューブ

ブにせん断力、推進力、およびスロットを抜ける放射方向への推進力を作用させることによってチューブを切断する。回転翼と静翼は非接触であるので、不純物が生じることはない。

(2) 高速回転分散器によるウニ型 SWCNTs の分解 (1) の方法はナノチューブを切断するために、せん断応力を用いて行う方法である。これに対して、短い SWCNTs がウニのように集まって成長している「ウニ型 SWCNTs」をせん断力によりバラバラにさせることによって、短いチューブが得られる可能性もある。

これらの方法には、回転速度、回転時間、溶媒種、ナノチューブの前処理（ナノチューブへの欠陥挿入など）のパラメータがあり、最適条件を見つけ出す必要がある。本研究は攻略法(1)の高速回転分散器を用いたナノチューブ切断の予備実験について得られた情報を報告する。

B. 研究方法

ナノチューブは、NanoLab 社の CVD 法で合成された純度 80 %、直径 20-40 nm、長さ 5-20 μm の MWCNTs を使用した。分散溶媒は、エタノール(特級) 100 mL に MWCNTs を 10 mg 入れ、超音波照射を 10 分間行った。その後、分散器に取り付け、約 25000 rpm で 15 分間回転させた。

処理後の試料は、日立 S-4100 走査形電子顕微鏡 (SEM) と日立 HF-2000 透過形電子顕微鏡 (TEM) でナノチューブの切断状況を観察した。

C. 研究結果

図 4-2 はエタノール分散液での分散器処理後の MWCNTs の SEM 像である。ナノチューブは長いが、ところどころに先端が観察される割合が多くなっていた。図 4-3 にエタノール分散液での分散器処理後の MWCNTs 先端の TEM 像を示す。明らかにナノチューブ軸に対して垂直方向に切断された像が観察された。これは高速回転分散器から生じるせん断力と推進力によるものと考えられる。この結果から、高速回転分散

器によって、ナノチューブを切断できることを確かめた。

D. 考察

今回の実験では、分散器ヘッドの周りだけが、回転翼、静翼装置に吸い込まれ、上部の分散液は下部のほうへ対流する効率が悪く、試料全体が効率よく回転翼、静翼装置に吸い込まれていなかった。このため、ナノチューブの切断効率が低下したと考えられる。上部層の分散液を下部の分散ヘッドに吸い込ませる工夫が必要である。また、ナノチューブの切断効率は回転翼、静翼で生じるせん断勾配とせん断フィールドに留まる滞在時間の積で決まる。滞在時間は分散溶媒の粘度に依存し、粘度が高すぎても流れが出来ず、低すぎてもせん断力の効力が落ちる。今回は粘性が 1.19 mPa s (at 293 K) のエタノールを使用した。粘性の異なる溶媒での実験、および回転時間の延長も必要である。

E. 結論

CNTs 長さ制御の現状とその攻略法を述べた。現状で使われているナノチューブの切断方法は表面が汚く、多くの欠陥がある。これに対して、ナノチューブにせん断力、推進力、およびスロットを抜ける放射方向への推進力を作用させることによってチューブを切断する高速回転分散器法と、「ウニ型 SWCNTs」をせん断力によってバラバラにさせ、短いナノチューブを得る方法を提案した。本研究では高速回転分散器法によるナノチューブの切断予備実験を行い、エタノール分散中の MWCNTs を切断できることを TEM で確認した。今後、回転速度、回転時間、溶媒種、ナノチューブの前処理などの最適条件を見つけ出す予定である。

5. 水溶化フラーレンの合成と異性体分離への試み

A. 研究目的

フラーレンが発見されて以来、さまざまな研究が行われてきた。中でも、フラーレンに化学修飾を施すことによって水溶性を持たせることにより、生物や医学の分野での応用が期待されるようになった。例えば、HIV 抑制剤、制癌剤や遊離基の化学的除去能力としての応用が考えられている。また放射性金属元素を内包したフラーレンを水溶化させることによって放射線追跡子（ラジオトレーサー）としての利用や、水溶化された Gd 内包フラーレンを磁気共鳴画像（MRI）の造影剤として用いることにより従来の造影剤（Gd 錯体）よりも強いコントラストを得られることが報告されており特に興味深い。

Chiang らや北澤らによって水溶化フラーレン（ $C_{60}(OH)_n$ ）の合成が報告されている。また、我々はフラーレン酸化物をスターティングマテリアルとして水酸化イオンの求核付加反応によるフラーレン二量体酸化物の合成法を開発している。この方法を応用してフラーレンに水酸基を導入することができれば、フラーレンに水溶性を持たせることができるのではないかと考えた。

また、 $C_{60}(OH)_n$ には水酸基の数が異なる異性体が存在すると考えられる。詳細なキャラクターゼーションを行うためには水溶化フラーレンの分離・精製が必要である。一般にフラーレンの分離には高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が用いられてきたが、これまでのフラーレン化学では主に有機溶媒系であり、水系においてはあまり分離技術の蓄積がない。そこで HPLC による水溶化フラーレンの分離についても検討していく必要がある。

B. 研究実験

水溶化フラーレンの合成は、まず C_{60} トルエン溶液に酸素を送り込みながら紫外線を照射す

ることでフラーレン酸化物を作製する（最近では UV 酸化の代わりにオゾンジェネレータを用いたオゾン酸化を行っている）。この処理は沈殿物が生成するまで続け、その沈殿物は濾過により回収した。次に、その沈殿物に対して pH13 以上の NaOH 溶液中で 12 時間水熱処理を行った。不溶成分は濾過により除去し、得られた溶液に含まれる Na イオンはイオン交換樹脂を用いて取り除き、水溶化フラーレンを得た。

合成した水溶化フラーレンの異性体分離には HPLC を用いた。展開溶媒は水/アセトニトリル = 1:1 とし、カラムは Wakosil II 5C18HG ODS カラムを用いて分離を試みた。

C. 実験結果

図 5-1 に合成した水溶化フラーレンの質量分析及び赤外線吸収スペクトルの結果を示す。質量分析からは C_{60} のピークが強く観測された。また IR スペクトルから、O-H 振動モード（ 3400cm^{-1} 付近）、C-O 伸縮振動モード（ $1200 \sim 1000\text{cm}^{-1}$ 付近）、C=O 伸縮振動モード（ 1700cm^{-1} 付近）が観測された。しかし、 C_{60} の振動モードはまったく観測されなかった。

図 5-2 には、水溶化フラーレンの異性体分離を行った際の HPLC チャートを示す。チャートからは実に多くのピークが観測された。図に示した部分の分取を行い、質量分析を行った。

D. 考察

水中に C_{60} が存在することから水溶化フラーレンの合成に成功したと考えられる。IR スペクトルから水酸基が存在するため、 C_{60} に水酸基が付加することで水溶化したと考えられる。

HPLC により分離を試みた結果、分離種からは質量スペクトルにおいて C_{60} のピークが観測された。このことから HPLC による異性体分離は可能であると考えられる。

E. 結論

我々の研究室で開発されたフラーレン二量体

酸化物の合成法を応用することで、水溶化フラーレンの合成に成功した。また、合成した水溶化フラーレンの異性体分離は、HPLC を用いることでその可能性を示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Kasuya, C. Milczarek, I. Dmitruk, Y. Barnakov, R. Czajka, O. Perales, X. Liu, K. Tohji, B. Jeyadevan, K. Shinoda, T. Ogawa, T. Arai, T. Hihara, K. Sumuyama “Size- and Shape-controls and Electronic Functions of Nanometer-scale Semiconductors and Oxides” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 202, 291 (2002)
2. O. P. Perez, H. Sasaki, A. Kasuya, B. Jeyadevan, K. Tohji, K. Chattopadhyay “Production of Monodispersed Particles by using Effective Size Selection” *Journal of Applied Physics*, 9, 6958 (2002)
3. C. N. Chinnasamy, A. Narayanasamy, N. Ponpandian, R. Justin Joseyphus, B. Jeyadevan, K. Tohji, K. Chattopadhyay “Grain Size Effect on the Neel Temperature and Magnetic Properties of Nanocrystalline NiFeO₄ Spinel” *Journal of magnetism and magnetic materials*, 238, 281 (2002)
4. K. Shinoda, T. Arai, H. Ohshima, B. Jeyadevan, A. Muramatsu, K. Tohji, E. Matsubara “Local Atomic Structure and Electronic State of ZnS Films Synthesized by using CBD Technique” *Materials Transactions*, 43 1512 (2002)
5. T. Kudo, Y. Akimoto, K. Shinoda, B. Jeyadevan, K. Tohji, T. Nirazawa, M. Waelchli “Characterization and Structures of dimeric C70 oxides, C140O, Synthesized with Hydrothermal Treatment” *The Journal of Physical Chemistry B*, 106, 4383 (2002)
6. H. Sasaki, O. P. Perez, B. Jeyadevan, K. Tohji, A. Kasuya “Size Selection of Fe₃O₄ Nanoparticles and their Magnetic Properties” *Journal of the Japan*

Society of Powder and Powder and Powder Metallurgy, 49, 135 (2002)

7. B. Jeyadevan, A. Hobo, O. P. Perez, C. N. Chinnasamy, K. Shinoda, K. Tohji, A. Kasuya “Solution Synthesis of Nanocrystalline Core-shell Structure NiCo Particles” *Journal of the Japan Society of Powder and Powder and Powder Metallurgy*, 50, 107 (2002)

8. B. Jeyadevan, C. N. Chinnasamy, O. P. Perez, K. Shinoda, K. Tohji, A. Kasuya “Auxiliary Aqueous Solution Processes for the Synthesis of Cobalt Ferrite with High Coercivity at Room Temperature” *Journal of the Japan Society of Powder and Powder and Powder Metallurgy*, 50, 114 (2002)

2. 学会発表

1. 佐藤義倫、小川貴之、前田 豊、若原孝次、赤坂 健、本宮憲一、篠田弘造、B. Jeyadevan、田路和幸、粕谷厚生、仁科雄一郎、“ウニ型 SWCNTs の電界電子放出特性”、第 23 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集、P33 宮城県、松島町 2002
2. 秋本結輝、大島仁志、篠田弘造、B. Jeyadevan、田路和幸、松本高利、長島雲平、“水溶化フラーレンを利用した ZnS 微粒子の作製”、第 23 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集、P79 宮城県、松島町 2002
3. 八久保鉄平、佐藤義倫、B. Jeyadevan、田路和幸、“ナノ炭素素材による CdS 光触媒の活性向上”、資源・素材 2002 要旨集、P211 (2002)
4. 浦川 潔、B. Jeyadevan、C. N. Chinnasamy、保々 旭、篠田弘造、田路和幸、“強磁性 FePt ナノ粒子の低温合成に関する研究”、資源素材学会 東北支部秋季大会要旨集、P16 (2002)
5. B. Jeyadevan、O. P. Perez、C. N. Chinnasamy、篠田弘造、田路和幸、粕谷厚生、“構造およびサイズ制御された Co 微粒子の作製および磁気特性”、第 26 回日本応用磁気学会学術講演概要集、P1 (2002)

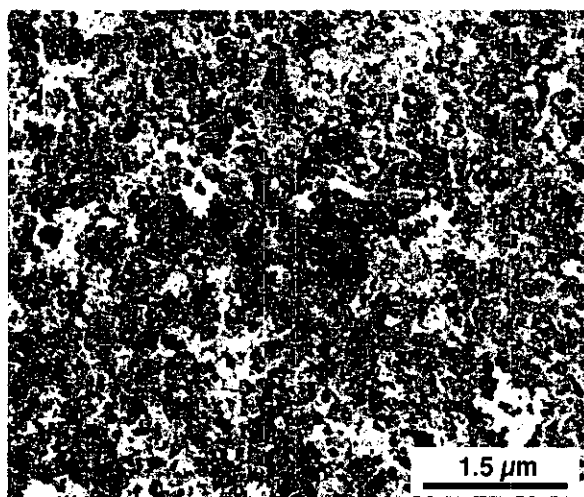


图 1-1

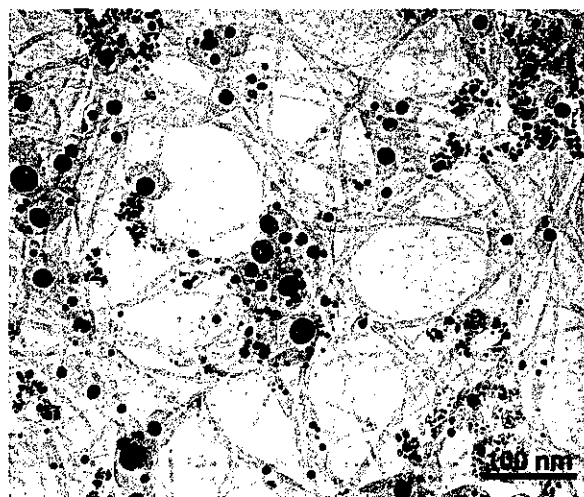


图 1-2

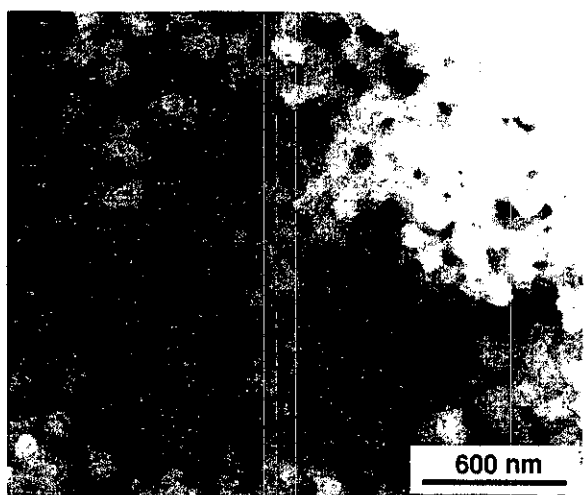


图 1-3



图 1-4

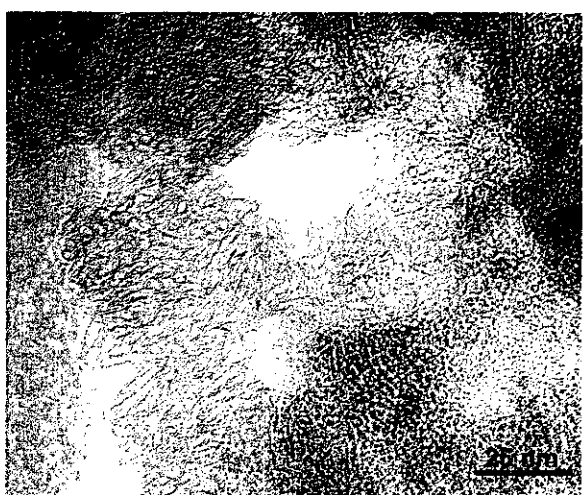


图 1-5

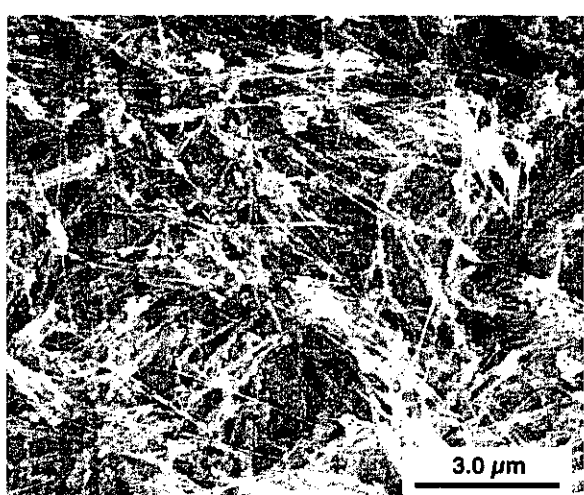


图 1-6

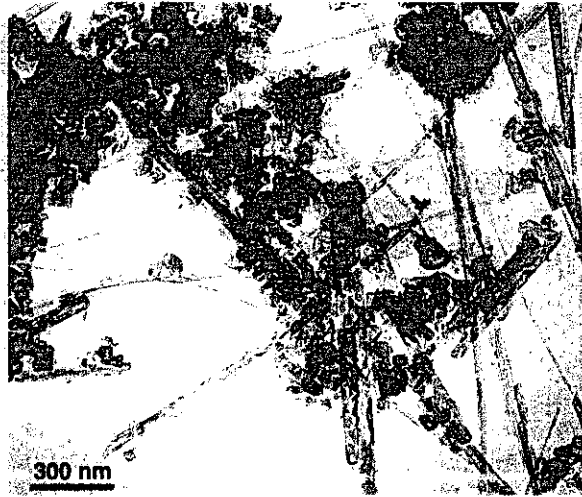


图 1-7

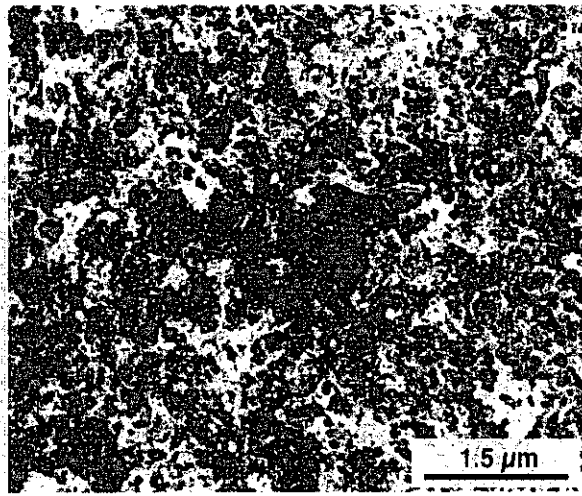


图 2-1

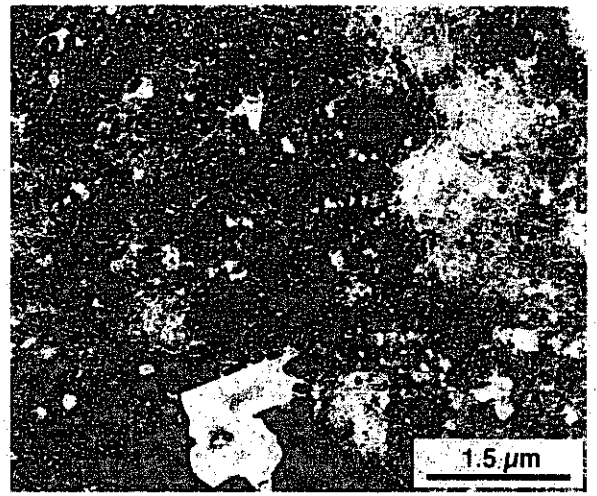


图 2-2

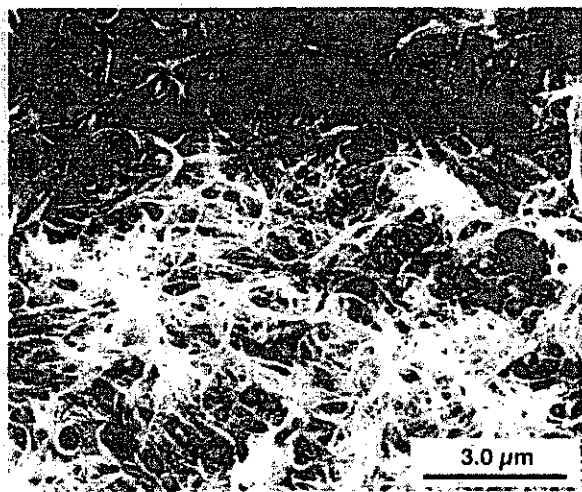


图 2-3

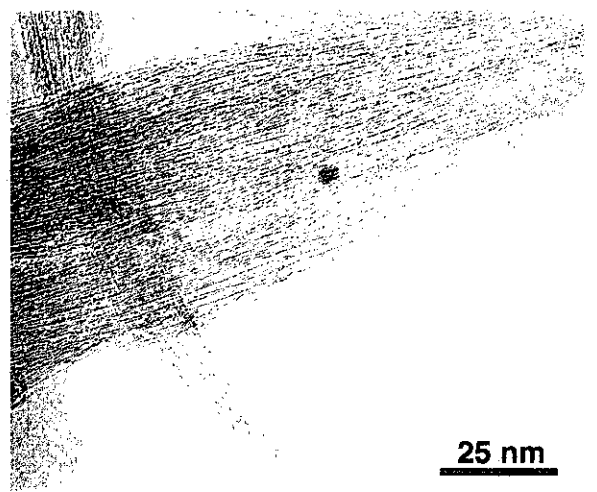


图 2-4



图 3-1

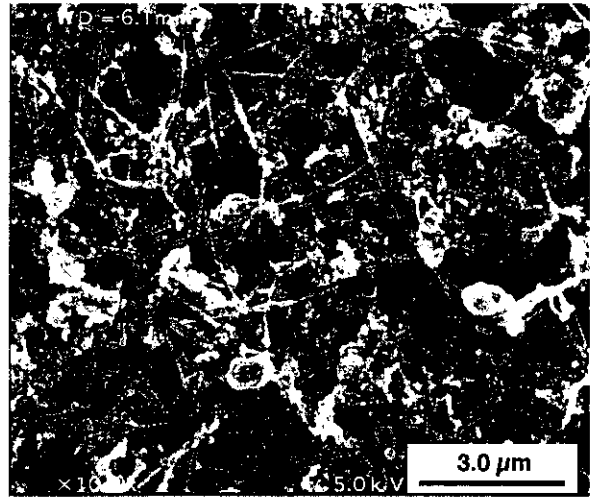


图 3-2

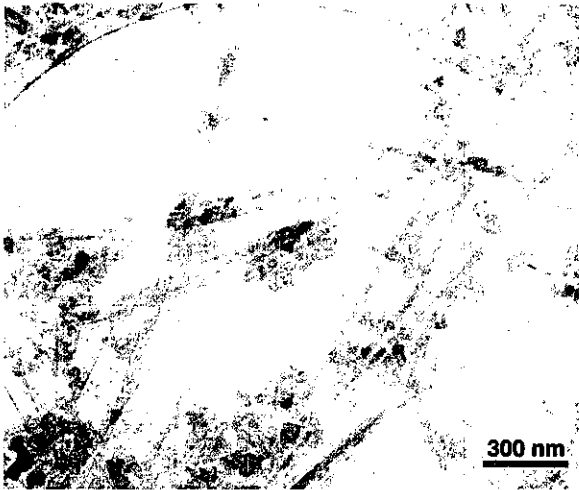


图 3-3

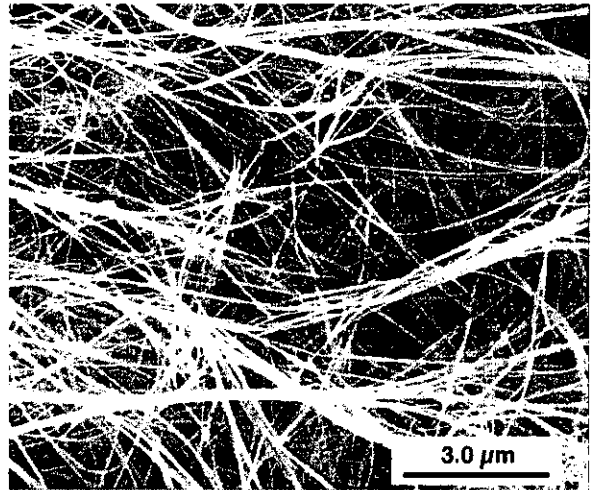


图 3-4

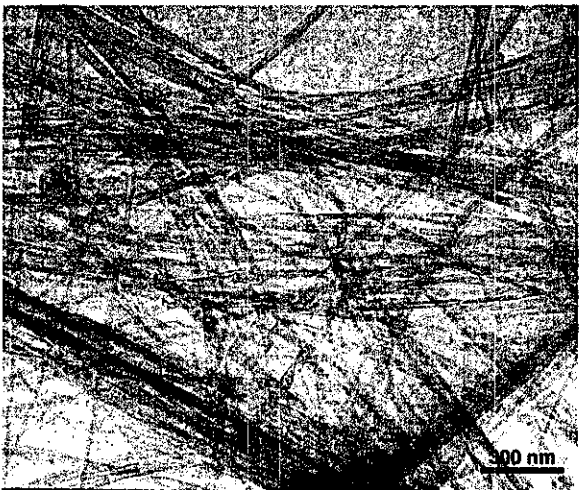


图 3-5

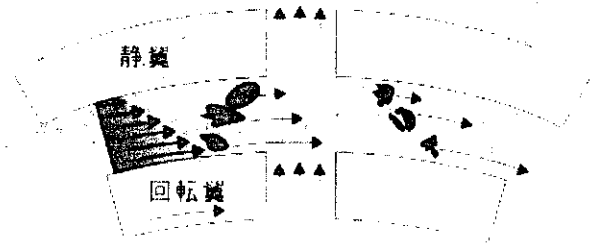


図 4-1

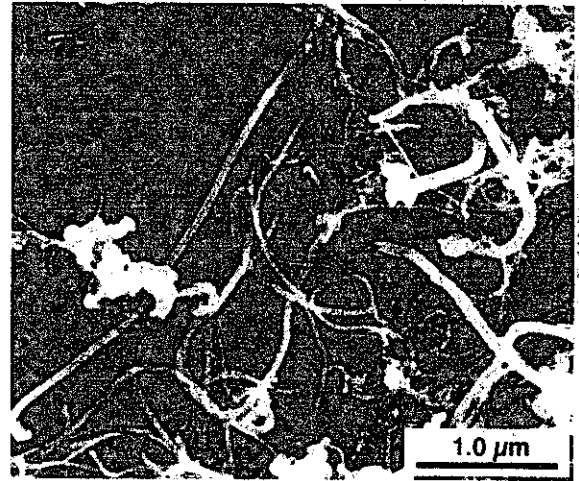


図 4-2

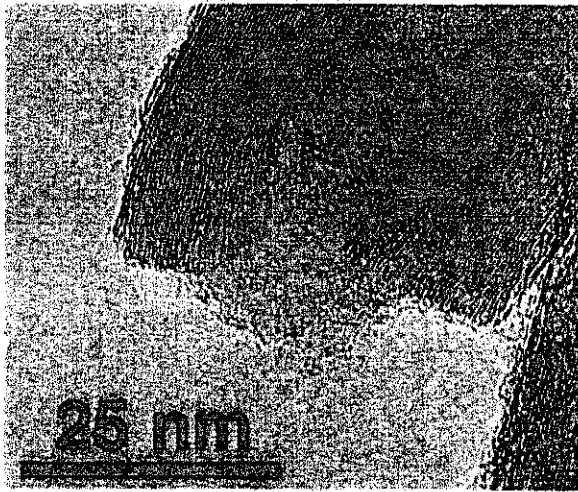
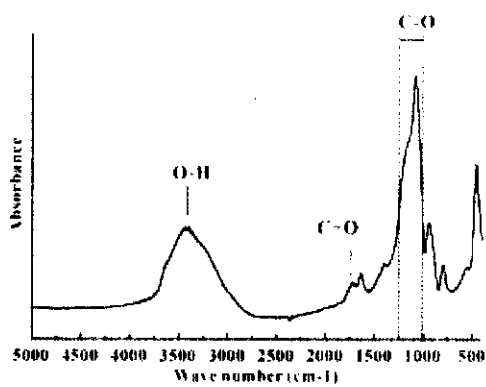
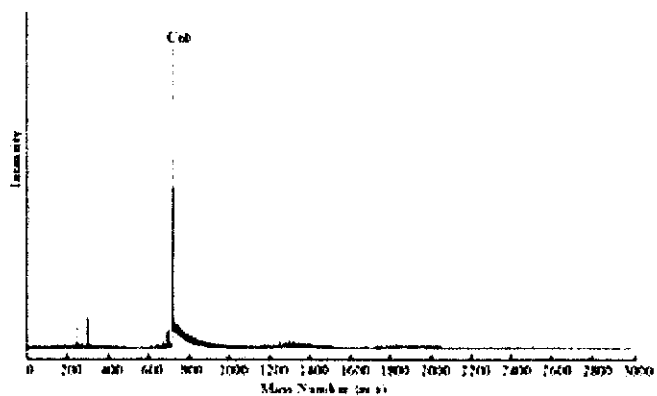
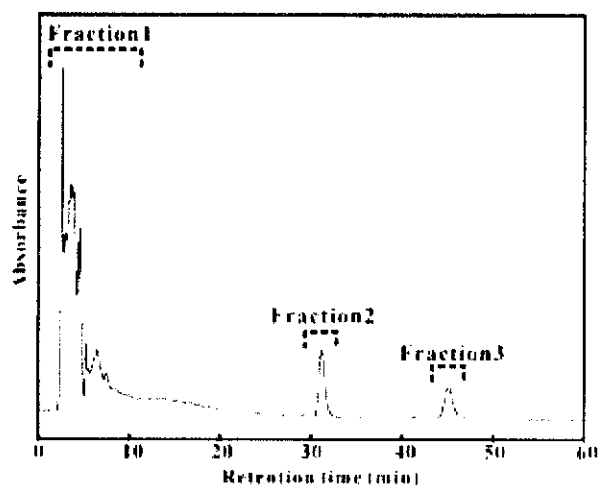


図 4-3



☒ 5-1



☒ 5-2

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

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に関する研究

分担研究者 戸塚 靖則 北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座教授
研究協力者 高師 則行 北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座助手
柏崎 晴彦 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座助手
田村 一央 北海道大学大学院歯学研究科口腔医学専攻大学院生

研究要旨 一般に生体親和性が優れているとされている生体材料も微粒子の場合には生体親和性が異なることが予想される。しかし、これまで生体材料の微粒子が、生体にどのような影響を及ぼすかについては、まだ十分に検討されていない。今回われわれは、顎口腔領域で使用されることの多いチタン微粒子とバイオ応用を目標としているカーボンナノチューブ、カーボンナノロッドの生体親和性について検討を行った。チタン微粒子および鉄、ニッケル、カーボンナノチューブ、カーボンナノロッドを、ラットの腹部皮下組織に埋入させて病理組織学的観察をした。採血したヒト末梢血から分離した好中球と混和して好中球の細胞生存率、好中球から放出される乳酸脱水素酵素活性値、活性酸素産生量、サイトカイン産生量を測定した。その結果、チタン微粒子および鉄、カーボンナノチューブ、カーボンナノロッドについては、病理組織学的観察から $10\mu\text{m}$ 以下の微粒子に対して周囲組織の炎症像を認めた。細胞生存率および LDH 活性値から、 $10\mu\text{m}$ 未満の微粒子は細胞に対して為害性が高く、また活性酸素産生量、サイトカイン放出量から $10\mu\text{m}$ 未満の微粒子に対して好中球は炎症反応を起こしていることが示唆された。一方、生体為害性があるとされているニッケルは、どのサイズも細胞に対して為害性が高かった。以上から、一般に生体親和性が高いとされている生体材料でも $10\mu\text{m}$ 未満の微粒子の場合は、細胞に対して炎症反応を惹起させることが認められた。ニッケルを除く $10\mu\text{m}$ 以上の微粒子では生体親和性が高いことが認められた。

A. 研究目的

今日の臨床において生体材料が治療に使用されているが、その際に化学的安定性や生体親和性が問題となる。チタンは顎口腔領域で使用される金属の中でもその表面に安定した不動態酸化被膜を作ることから、耐蝕性に優れた生体親和性の良い材料とされており、主にデンタルインプラントや骨接合用のミニプレートとして用いられている。しかし、チタンインプラント周囲の軟組織中にチタン微粒子の存在を報告した論文が多数あり、またチタンイオンが細胞機能を阻害するとの報告がある。したがって、一般に生体親和性が優れているとされている生体材料でも微粒子の場合には生体親和性が異なることが予想される。しかし、これまで生体材料の微粒子が、生体にどのような影響を及ぼすかについては、まだ十分に検討されていない。今回われわれは、顎口腔領域で使用されることの多いチタン微粒子とバイオ応用を目標としているカーボンナノチューブの生体親和性について検討を行った。

B. 研究方法

チタンの粒子は、0.5, 3, 10, 50, 150 μm のサイズを、二酸化チタンの粒子は 0.1, 0.5, 3 μm のサイズを使用した。カーボンナノチューブ (CNT) およびカーボンナノロッド (CNR) は東北大学大学院工学研究科田路教授が開発したものをを用いた。また、比較対照として鉄およびニッケル粒子を使用した。

・形態学的観察

ウィスラー系雄ラット (10-12 週齢, 体重 300-350 グラム) の腹部皮下組織に 3 μm と 10 μm のチタン粒子およびカーボンナノチューブ, 2 μm の鉄粒子, 0.2 μm のニッケル粒子を埋め込み、その後周囲軟組織を含めて摘出し、HE 染色を行い病理組織学的に観察した。

・細胞機能試験

ヒト好中球は健常人から採血したあと、通法に従い、6%ヒドロキシエチルデンプン加生食水と Ficoll-hypaque を用い分離し、生理食塩水で洗浄し用いた。その好中球に各微粒子の試料を混和し、37°C で 30 分間インキュベートしたものを

検体とし、以下の項目を測定した。

細胞生存率の算定

各検体をトリパンブルーで染色し、色素排除法にて光学顕微鏡下で生細胞数をカウントした。

乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性値の測定

各検体を乳酸基質・ジアホラーゼ法にて LDH 活性値を測定した。

活性酸素産生量の測定

チトクローム C 還元法で、各検体を PMA (ホルボールミスチン酸アセテート) で刺激して二波長分光光度計を用い好中球から産生された活性酸素産生量を測定した。

サイトカインの測定

ELISA 法により好中球から放出された TNF- α 、IL-1 β の産生量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は北海道大学歯学部動物実験に関する指針に基づき行った。

本研究のヒト好中球を用いた研究は、北海道大学大学院歯学研究科・歯学部倫理委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

形態学的観察

3 μ m チタンでは、1 日目に周囲に炎

症性細胞の浸潤 (写真 1)、3 日目に微粒子の貪食像を認め (写真 2)、7 日目には微粒子の限局化を認めた (写真 3)。10 μ m のチタンでは、3 日目で炎症細胞の浸潤は認めるものの、貪食像は認めなかった (写真 4)。カーボンナノチューブでは、1 日目にカーボンナノチューブは見えないが、マクロファージを中心とした炎症性細胞の浸潤を認めた (写真 5)。3 日目では限局化したカーボンナノチューブと周囲の毛細血管の増生および好中球の浸潤を著明に認めた (写真 6)。5 日目では巨細胞の出現および毛細血管と線維芽細胞の増生からなる肉芽組織に、軽度の好中球浸潤とマクロファージの集簇巣が見られた (写真 7)。2 μ m の鉄粒子では、3 μ m のチタンと同様に貪食像を認めた (写真 8)。0.5 μ m のニッケル粒子では、貪食像の他に周囲に多数の壊死した組織が見られた (写真 9)。

細胞生存率

コントロールおよび 10 μ m 以上の大きさのチタン、鉄と比較して、10 μ m 以下のチタンや鉄、CNT、CNR と混和した好中球の細胞生存率は低い傾向が認められた。一方ニッケルはどのサイズでも低い傾向が認められた (図 1)。