

応用研究が集中的に行われている。CNT のバイオ応用を考えた場合、目的に応じて、一本一本の独立したチューブとしての利用、または凝集体としての利用等、様々な形態における応用の可能性が考えられる。

はじめに、CNT の細胞培養担体としての可能性を検討するため、細胞培養実験に使用可能な形態であるろ過膜上への多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の固定化を試みた。

次に、歯科材料や生体材料としての CNT の可能性を検討するため、歯質表面への CNT 吸着による固定化を試みた。

B. 研究方法

ろ過膜上への固定化

200 μ g の MWCNT (NanoLab) を 100mL の脱イオン水へ加え、超音波処理を 15 分間行い MWCNT を分散させた。超音波処理後の MWCNT 分散液は再凝集を防ぐため、すぐに吸引濾過操作を行った。吸引濾過には、PTFE 膜 (Polytetrafluoroethylene、孔径 1.0 μ m、直径 47mm、アドバンテック) および PC 膜 (Polycarbonate、孔径 0.8 μ m、直径 47mm、アドバンテック) を使用し、濾過前には脱イオン水にて十分湿らせた。吸引濾過後の MWCNT 固定膜は、膜の収縮を防ぎながら乾燥させるため、吸引濾過器に保持したまま 60 $^{\circ}$ C にて乾燥させた。また、MWCNT のみの膜作製のためには 100mg の MWCNT を用い、上記と同様な操作を行い、最後にろ過膜上より MWCNT 膜を剥がした。

歯質への固定化

CNT は MRT 社より購入した多層カーボンナノチューブ (MWCNT) (平均直径 200-400nm、長さ 1-10 μ m) をそのまま使用した。歯質試料は、ヒ

ト抜去臼歯を切断砥石 (disco, GC320NB50-0.4、リファインカット) を用いて歯軸に直行する面 (横断面) および平行する面 (縦断面) で切断し、厚さ約 100~500 μ m の歯質スライスとした。

歯質スライスのエッチング処理は、以下の様に行った。歯質スライスを 35%リン酸へ浸し、室温にて 1 分または 5 分間エッチング処理を行った。その後、歯質スライスを脱イオン水にて十分洗浄し、水中にて超音波洗浄を行った。洗浄した歯質スライスには直ちにアセトンへ移し脱水後、室温にて乾燥した。

歯質スライスへの CNT の吸着操作は以下の様に行った。MWCNT の水溶液 (10mg/10mL) へエッチング処理した歯質スライスを加え、30 分間室温にて攪拌した。続いて脱イオン水にて洗浄後、アセトン脱水し乾燥した。

C. 研究結果

ろ過膜上への固定化

図 2 には、100mg の MWCNT をろ過膜上へ固定し、乾燥後ろ過膜より剥がした MWCNT 膜の写真を示した。図 3 および図 4 には、PC 製および PTFE 製ろ過膜に、MWCNT を 200 μ g ろ過した膜の写真を示した。

図 5 および図 6 には、MWCNT をろ過した PTFE 膜の写真およびその強拡大像を示した。

歯質への固定化

水溶液中にてコラーゲン繊維と MWCNT を混ぜ、スライドガラス上に一部を滴下し、SEM 観察した結果を図 7 と図 8 に示した。

図 9 には、酸処理後の歯質スライスの写真を示した。図 10 と図 11 は、酸処理 1 分し MWCNT 分散液へ 30 分浸した後の歯質スライスおよび酸処理 5 分し MWCNT 分散液へ 10 秒浸した後

の歯質スライスの写真を示した。

酸処理1分、MWCNT分散液へ30分浸した後の歯質スライスの象牙質(図12、図13)およびエナメル質(図14、図15)、酸処理5分、MWCNT分散液へ10秒浸した後の歯質スライスの象牙質(図16、図17、図18)およびエナメル象牙境(図19、図20)を示した。

D. 考察

— ろか膜上への固定化 —

MWCNT (NanoLab) 分散液を吸引濾過により濾過膜上への固定化を試みた。MWCNT (NanoLab) を100mg用いた場合、濾過膜上に固定化したMWCNTは濾紙からはがすことが可能となり、ある程度の強度を持った紙のような状態となった(図2)。これは濾紙上でMWCNTが濃縮されることによりMWCNT同士で物理的な結合(ファンデルワールス力等)を起し、そのために濾紙から壊れることなく剥がすことができる程度の強度を持つようになったと考えることができる。また濾過するMWCNTの量を50mgと少なくした場合、濾紙よりはがす際に壊れてしまった。このことより、直径3.5cm(現在使用している吸引濾過機の規格により)のペーパーを作る場合には、100mg前後が適当であると考えられる。

次に、濾過する際のMWCNTの量を減らして200 μ gとし、薄いMWCNTの層を持った濾過膜を作製した。図4はPTFEを用いた場合であり、表面に不均一なコート状態を示していた。一方、図3はポリカーボネート(PC)を用いた場合であり、表面は均一なコート状態を示していた。MWCNTを固定化したPTFE表面が不均一なのは、もともとPTFE膜表面自体が不均一であることと、MWCNTが200 μ g程度では、その不均一の構造を埋めることができないためと考えられる

(図5、図6)。一方で、PC膜表面は均一な平らな状態でありMWCNTも均一な層を形成したと考えられる(SEMデータ示さず)。

以上の結果より、吸引濾過という非常に簡単な方法によりMWCNTの濾紙上への固定化を達成することができた。

— 歯質への固定化 —

エッチングした歯質スライスをCNT溶液中で攪拌し表面観察を行った。図9、10、11にはデジタルマイクロスコープにて観察した歯質スライスへのMWCNT(a)未処理横断面、(b)5分吸着済横断面、(c)10秒吸着済横断面を示した。その結果、吸着後では象牙質部分の明らかな黒色化が観察されたが、エナメル質では観察されなかった。このMWCNT吸着の選択性は象牙質とエナメル質の表面成分の違いに起因すると推測される。

MWCNT吸着象牙質のSEM観察を行った結果、象牙質表面へのMWCNTの吸着(図12、図13)、さらに象牙質表面に露出したコラーゲン繊維へ吸着している様子(図16、図17、図18)が観察された。一方で、エナメル質ではMWCNTの吸着は観察されなかった(図14、図15)。また、より明確に観察するためエナメル象牙境を観察したところ(図19、図20)、明らかな選択的吸着が観察された。別のコントロール実験として、コラーゲン繊維とMWCNTを混ぜSEM観察を行ったところ(図7、図8)、コラーゲン繊維部分にMWCNTが多く存在し、MWCNTとコラーゲンが相互作用することが分かった。

これらの結果よりMWCNTと象牙質の吸着はコラーゲン繊維を介して行われることが明らかとなり、またMWCNT表面の疎水性とコラーゲン繊維の疎水性部分により結合していると考え

られる。

E. 結論

— ろ過膜上への固定化 —

MWCNT 上で細胞培養を行うため、ろ過膜上へ MWCNT の固定化を検討した。PTFE 製や PC 製ろ過膜を用い MWCNT 分散液をろ過したところ、MWCNT はそれ自身で凝集しながらろ過膜上に固定化されることが分かった。ろ過による固定化は操作が簡単であり、MWCNT 濃度や種類も容易に変えることができ、細胞培養における MWCNT の影響を検討するためには有効であると考えられる。

今後、MWCNT (NanoLab) だけでなく、様々なカーボン材料 (MWCNT (MTR), SWCNT, カーボンナノファイバー) を用いた濾過膜の作製や、多数の濾過膜を同時に作製する方法を検討する予定である。

— 歯質への固定化 —

歯科材料や生体材料としての CNT の可能性を検討するため、歯質表面への CNT 吸着による固定化を試みた。今回は、培養基材へ MWCNT を固定化することを目的に、歯質を例にとり検討を行った。その結果、MWCNT の分散水溶液にエッチング処理した歯質スライスを加え攪拌したところ、象牙質への選択的な MWCNT の吸着が観察された。一方で、MWCNT の吸着はエナメル質には観察されず象牙質に選択的であることが分かった。象牙質への固定化は、コラーゲンを介した疎水的な相互作用により吸着していると考えられる。MWCNT がコラーゲンに吸着する性質を利用して細胞培養基材への MWCNT 固定化を検討する予定である。

2. カーボンナノチューブの表面修飾

A. 研究目的

カーボンナノチューブに生物学的に重要な分子を結合させることは、様々なバイオ応用を考える上で重要である。他の研究者により、化学的および物理的な方法によりプロテイン、DNA、タンパク質、酵素、多糖等の分子を結合させた報告がなされている。しかしながら、近年次世代ポストゲノムとして注目を集めている糖鎖を結合させた報告はまだない。また、生体親和性を持つアパタイト等の無機材料によって MWCNT の表面修飾を行った例も少ない。

そこで初めに、市販されている人工複合糖質高分子を用いて、MWCNT に対する物理吸着を利用し表面修飾を検討した。

次に、アパタイトによる表面修飾を目指して、MWCNT 表面へのイオンの吸着により、表面修飾が可能か検討を行うことにした。バイオ分野への応用を考慮に入れ、イオン混合物はアパタイトの再石灰化に用いられる溶液を選択し検討した。

B. 研究方法

— 糖質による表面修飾 —

糖質化合物による MWCNT の修飾

MWCNT (NanoLab または MTR) を PBS に加え濃度 $25\mu\text{g}/500\mu\text{L}$ とし、超音波処理を 15 分間行った。この溶液に $10\mu\text{g}$ の糖質化合物 (またはその蛍光ラベル化物) を加え、さらに 15 分間超音波処理を行い 30 分間インキュベートした。その後、遠心分離 ($14,000\text{rpm}$, 10min) により MWCNT を底に集め、PBS \times 3 回による洗浄を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察を行うため MWCNT 凝集体を少量の PBS に超音波を使用せずに分散させ、一部をスライドガラス上

へ滴下し乾燥を防ぐためカバーガラスをした。CLSM 観察は、スライドガラス上で MWCNT の凝集体を探し、レーザー透過像 (488nm アルゴン)、FITC 像 (ex 488nm Ar, em 515-565nm)、Rhod 像 (ex 543nm He-Ne, em 590nm 以上) を得た。

MWCNT/糖質化合物とレクチン (またはアビジン) の相互作用

少量の MWCNT (NanoLab または MTR)/糖質化合物を PBS に加え、(Rhod-または FITC-) RCA₁₂₀、(Rhod- または FITC-) ConA、FITC-EEL、FITC-Streptavidin を最終濃度 450nM となるように加えた。1 時間インキュベート後、遠心分離 (14000rpm, 10min) により MWCNT を集め、PBS × 3 回による洗浄を行った。上記と同様に溶液としたものを CLSM により観察した。

MWCNT とレクチンの相互作用

MWCNT (MTR) を PBS (+) に加え濃度 25 μ g/500 μ L とし、超音波処理を 15 分間行った。この溶液に Rhod-RCA₁₂₀ または Rhod-ConA を最終濃度 450nM となるように加え、1 時間インキュベートした。その後、遠心分離 (14,000 rpm, 10min) により MWCNT を集め、PBS × 3 回、H₂O × 2 回による洗浄を行った。溶液としたものを CLSM により観察した。

アルブミン共存下における MWCNT/Tri-Man-BSA とレクチンの相互作用

少量の MWCNT (MTR)/Tri-Man-BSA を PBS に加え、さらに 20 μ g の BSA を加え 10 分間インキュベートした。続いて、FITC-RCA₁₂₀ または FITC-ConA を最終濃度 450nM となるように加え、1 時間インキュベートした。遠心分離 (14000rpm, 10min) により MWCNT を集め、PBS

× 3 回による洗浄を行った。上記と同様に溶液としたものを CLSM により観察した。

アパタイトによる表面修飾

100mL の再石灰化溶液 pH7.2 (1.4mM NaCl, 1.6mM KCl, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.05mM MgCl₂, 2mM K₂HPO₄, 50mg/L FNa) に、MWCNT (NanoLab または MTR) を 1 mg 加えた。15 分間超音波処理を行い、37 $^{\circ}$ C にて 2 週間静置した。その後、遠心分離 (4000 rpm, 10 分) にて MWCNT を集め、50mL 脱イオン水にて 2 回洗浄した。

C. 研究結果

糖質による表面修飾

FITC-PVLA を MWCNT (NanoLab 社製、MTR 社製) へ水溶液中で吸着させ精製後、CLSM にて MWCNT 凝集体を観察した結果を図 2 1 に示した。次に、MWCNT 表面に吸着した糖鎖の機能を調べるため、糖質高分子/MWCNT に対するレクチン結合試験を行った。図 2 2 には、FITC-PVLA/MWCNT に対する Rhod-RCA₁₂₀ または Rhod-ConA の結合試験の結果を、図 2 3 には、PVLA/MWCNT または PVCA/MWCNT に対する FITC-RCA₁₂₀ の結合試験の結果を示した。また、レクチンの MWCNT への非特異吸着を調べるため、はだかの MWCNT と Rhod-RCA₁₂₀ および Rhod-ConA を相互作用させ CLSM にて観察した結果を図 2 4 に示した。

ポリスチレン型人工糖質高分子にて修飾した MWCNT とレクチンとの結合試験のまとめた結果を図 2 5 に、ビオチンラベル化人工複合糖質高分子のまとめた結果を図 2 6 に、ポリアクリルアミド型人工複合糖質高分子とのまとめた結合試験を図 2 7 に示した。高分子でなく糖質系界面活性剤を用いた場合を図 2 8 に示した。

また糖鎖結合型アルブミンの結果を図 2 9 に、糖鎖結合型アルブミンへの BSA 共存下での結果を図 3 0 に示した。

ー アパタイトによる表面修飾 ー

MWCNT を人工唾液に浸し、2 週間静置後の MWCNT 表面に析出する化合物を SEM にて観察した。

MWCNT (MTR 社製) を用いて析出させたときの場合を図 3 1 に示し、その凝集体の異なった地点を強拡大にて観察した結果を図 3 2、図 3 3、図 3 4 に示した。また、特に MWCNT から析出している様子が観察できた SEM 像を図 3 5、図 3 6 に示した。

MWCNT (NanoLab 社製) を用いて析出させたときの場合を図 3 7 に示し、その凝集体の異なった地点を強拡大にて観察した結果を図 3 8、図 3 9、図 4 0 に示した。

D. 考察

ー 糖質による表面修飾 ー

ポリスチレン型人工糖質高分子による MWCNT の修飾

(1) ポリスチレン型人工糖質高分子とレクチンの相互作用

人工糖質高分子を用いて物理吸着により MWCNT の表面修飾が可能であるか検討を行った。人工糖質高分子と MWCNT を混ぜた場合における PVLA の MWCNT への結合を明らかに観察するため、FITC ラベルされた PVLA である FITC-PVLA を用いて溶液中における蛍光顕微鏡観察を行った。MWCNT/FITC-PVLA の CLSM 観察結果を図 2 1 に示した。MWCNT (NanoLab) の顕微鏡観察場合、チューブ直径が細いためチューブの一本一本を観察することはできなかったが、

MWCNT (NanoLab) /PVLA の凝集体の輪郭に蛍光が観察された (図 2 1 上段)。MWCNT (MTR) での観察では、チューブ直径が太いためさらに明確に蛍光が観察され、ナノチューブの長さに沿って密に蛍光が観察された。このことより、MWCNT の表面に密に PVLA が結合していることが明らかとなった。MWCNT と PVLA の結合は疎水性同士による相互作用と考えられるが、一般的に糖鎖自身は親水性が高いため MWCNT とは結合しない、または弱い力でしか結合しないことが考えられる。よって、糖鎖による MWCNT の表面修飾のためには、糖質高分子である PVLA を用いることにより容易に達成されることが明らかとなった。

続いて、MWCNT/PVLA に関して、表面に結合させた糖鎖 (この場合、 β -ガラクトース) が生物学的な認識シグナルとなるか検討するため、糖鎖を認識するシグナルであるレクチンを用いた結合実験を行った。初めに MWCNT (MTR) /FITC-PVLA と蛍光ラベル化レクチンを相互作用させ、CLSM 観察した結果を図 2 2 に示した。MWCNT (MTR) /FITC-PVLA と Rhod-RCA₁₂₀ (β -Galactose specific lectin) との相互作用では、Rhod-RCA₁₂₀ の蛍光がナノチューブの長さ方向にそって局在し、それは MWCNT に結合した FITC-PVLA の局在と一致していた。一方、Rhod-ConA (α -Mannose or α -Glucose specific lectin) との相互作用では、Rhod-ConA に由来する蛍光は観察されなかった。これらのことは、MWCNT の表面に存在する糖鎖が、相当するレクチンにより選択的に認識されることを示している。選択性は、MWCNT 表面の糖鎖を変えた場合にも観察され (図 2 3)、PVLA (β -ガラクトース末端を持つ) で修飾した MWCNT は RCA₁₂₀ により認識されるが、PVCA (β -グルコースを持

つ)でのものは認識されなかった。コントロール実験として、はだかのMWCNTとレクチンの相互作用を同様に検討した結果(図24)、MWCNTへのレクチンの吸着(非特異吸着)が観察された。また異なる見方をすれば、先ほどの図22で観察された選択的な認識は、MWCNTへPVLAが密に吸着することによって起こり、レクチンの非特異的吸着を起こすスペースがない程に糖鎖がMWCNT表面を覆っていることを示している。別の言い方をすると、MWCNTの表面の糖鎖は、認識シグナルとなるとともに、MWCNT表面への非特異吸着をブロックする役割も果たしていると考えられる。

以上の結果をまとめると、糖鎖でMWCNTの表面修飾を行うためには、PVLAなどの人工複合糖質高分子(疎水性を持つ)を用いれば容易に達成できることが示された。その結合は、PBSやH₂Oでの洗浄でははがれない程度に強く、また、PVLAはMWCNTの表面にチューブの形に添って密に配置している。MWCNTの表面の糖鎖は、相当するレクチンにより選択的に認識されるとともに、非特異的な吸着をブロックする働きを持っていることが明らかとなった(図25)。

*以下、模式図にて実験結果をまとめて示す。

(2) ビオチンラベル化 ポリスチレン型人工糖質高分子とアビジンの相互作用

糖鎖構造に由来した選択性ばかりでなく、バイオ研究分野で頻りに利用されるビオチン-アビジンの選択的な認識をMWCNTへ導入可能か検討を行った(図26)。ビオチンと糖鎖の両方を側鎖に持つビオチンラベル化PVLAを用いてMWCNTを修飾し、得られたBiotin-PVLA/MWCNTに対するストレプトアビジンの結合を観察した。その結果、コントロールとして用いたビオ

チンラベル化されていないPVLAで修飾したMWCNTに対してストレプトアビジンは結合しないが、Biotin-PVLAで修飾したMWCNTへは結合が観察された。また、はだかのMWCNTに対してストレプトアビジンは非特異吸着を起こすので、上記の結果は、MWCNT表面上にてBiotin-Avidinの選択的な認識が行われていると考えられる。これらのことより、Biotin-Avidinの選択的な認識を利用する場合、Biotin-PVLAを用いてMWCNTを修飾すれば、非特異吸着を抑制し選択的な認識が得られることが明らかとなった。

ポリアクリルアミド型人工糖質高分子によるMWCNTの修飾

(3) ポリアクリルアミド型人工糖質高分子とレクチンの相互作用

ポリスチレン型人工糖質高分子の有用性が示されたが、ポリアクリルアミド型人工糖質高分子でもレクチンとの選択的な認識が行われるか検討した(図27)。 α -ガラクトースを側鎖にもつポリアクリルアミド(BP-Probe)を用いて同様にMWCNTの表面修飾を行いレクチンとの結合を観察した結果、RCA₁₂₀・ConA・EELはどれもMWCNT表面へ結合し、選択的な認識は示さなかった。今後詳細な検討を必要とするが、選択性が現れない原因としてポリアクリルアミド型はポリスチレン型よりもMWCNTへの吸着力が弱く、修飾したMWCNT表面が部分的にはだかになっているため、非特異吸着が起きたことが推測される。

糖質系界面活性剤によるMWCNTの修飾

(4) 糖質系界面活性剤とレクチンの相互作用

高分子ではなく低分子である糖質系界面活

性 剤 (n-Octyl galactoside or n-Octyl glucoside) で MWCNT を処理した場合、レクチンとの選択的な認識が行われるか検討した (図 28)。RCA₁₂₀ との結合を観察したところ、糖質系界面活性剤 (n-Octyl galactoside or n-Octyl glucoside) の種類にかかわらず、レクチンの結合が観察された。これらの結果は、糖質系界面活性剤は MWCNT 表面へ強く結合しない、洗浄すると除去されてしまう、MWCNT 表面上で動くなどが原因となり選択性が発現しないと考えられる。今後は、より長い脂質部分を持った天然型の糖脂質で検討する予定である。

糖鎖結合型アルブミン (またはアルブミン) による MWCNT の修飾

(5) 糖鎖結合型アルブミンとレクチンの相互作用

天然高分子の 1 つであるタンパク質、人工的に糖鎖を結合させたアルブミンを用いて MWCNT 表面を修飾した場合、レクチンによる選択的な認識が行われるか検討を行った (図 29)。マンノース 3 糖を結合させたアルブミン (Tri-Man-BSA) で MWCNT を処理し、レクチンとの相互作用を検討した結果、糖鎖の構造に関係なくレクチンの非特異吸着が観察された。また、コントロールとして BSA のみで MWCNT を処理した場合も同様に、レクチンの非特異吸着が観察された。以上の結果より、糖鎖結合型アルブミンで MWCNT を処理しただけでは、選択的な認識が行われなことが分かった。考えられる原因として、洗浄による MWCNT 表面からの部分的な Tri-Man-BSA または BSA の脱落が挙げられる。

(6) アルブミン共存下における糖鎖結合型ア

ルブミンとレクチンの相互作用

上記で糖鎖結合型アルブミンが洗浄により脱落することを補うため、洗浄後にアルブミンを共存させた条件下 (MWCNT 表面の露出した部分をブロックさせるため) でレクチンとの相互作用を検討した (図 30)。その結果、Tri-Man-BSA で処理した MWCNT は、相当するレクチンにより選択的に認識された。また、糖鎖の結合していないアルブミンの場合、両方のレクチンの非特異吸着は観察されなかった。これらの結果は、糖鎖結合型アルブミン (またはアルブミン) は洗浄中に部分的に MWCNT 表面より脱落してしまい、レクチンとの認識を行う際にアルブミンを共存させると洗浄中に脱落して露出した MWCNT 表面へアルブミンが吸着し非特異的吸着を抑えるためと考えることができる。以上のことより、糖鎖結合型アルブミンは条件付ではあるが、糖鎖の選択的認識を必要とする目的に使用可能である可能性が示された。

— アパタイトによる表面修飾 —

生体親和性を持つ物質での MWCNT 表面修飾を目指し、カルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液中からの MWCNT 上での析出を検討した。

再結晶化後の MWCNT (MTR) の SEM 像 (図 31) では、主に 3 種類の構造物が観察された。観察場所 A (図 32) では、明らかな結晶 (平均: 長さ 1 μ m、太さ 200nm) として観察され、放射状に密に結晶成長していた。観察場所 B (図 33) では、観察場所 A の様な明らかな結晶は見られず、MWCNT の形状が観察された。注意深く観察すると、チューブ表面にアモルファス状の物質が覆い尽くすことによりチューブが太くなっている状態が観察された。また、チューブ末端が特に丸く大きく成長している像も多くのチ

チューブで観察された。観察 C (図 3 4) では、チューブを含んだ板状の物質が観察された (SEM 像では平面上であるため分かりにくい)。板状物質に含まれるチューブの太さより推定すると厚さは 200nm 前後と考えられる。

さらに結晶の成長点を知るため、MWCNT (MTR) から結晶が成長している箇所を探し SEM 観察した結果を図 3 5 および図 3 6 に示した。これらの像からは、MWCNT の表面にアモルファス様の物質が観察され、さらに MWCNT をコアとし放射状に結晶が成長した様子が観察された。当初、MWCNT の末端からの結晶成長が多く観察されるのではと予想していたが、チューブの途中の地点からの結晶成長が多く観察された。

続いて、MWCNT の由来による結晶成長を観察するため、再結晶化後の MWCNT (NanoLab) の SEM 観察を行った。MWCNT (NanoLab) の SEM 像 (図 3 7、図 3 8) では、MWCNT 凝集体の表面一面に結晶が成長している様子が観察された。生成している結晶の量は MWCNT (MTR) の場合よりも多く観察された。さらに、MWCNT (NanoLab) をコアとした結晶成長地点も同様に観察された (図 3 9、図 4 0)。成長した結晶の大きさは、MWCNT (MTR) の時よりも細いことが観察され、MWCNT (MTR) の場合に観察された板状の物質は観察されなかった。また、MWCNT (NanoLab) の場合、結晶はチューブに対して放射上に析出したものと、チューブに沿っているように析出しているよう思われた。析出の機構に関する詳細は、現在のところ不明であるが、MWCNT の欠陥点から析出している可能性等が考えられる。

これらの結果より、再結晶化溶液に MWCNT を浸しておけば MWCNT をコアとした結晶成長が起こることが判明した。さらに、MWCNT の由来の違いにより結晶の量、形状などが異なることが

推測され、結晶成長がナノチューブの構造に敏感である可能性が示唆された。

E. 結論

ー 糖質による表面修飾 ー

MWCNT のバイオ分野でのさらなる応用のため糖鎖による MWCNT 表面修飾を目指した。今回、検討した糖鎖化合物は①ポリスチレン型人工糖質高分子、②ポリアクリルアミド型人工糖質高分子、③糖質系界面活性剤、④糖鎖結合型アルブミンを用い、表面修飾および糖鎖認識に関して検討を行った。

①ポリスチレン型人工糖質高分子を用いた場合、MWCNT 表面は密に糖鎖で覆われた。また表面の糖鎖は相当するレクチンにより選択的に認識された。ビオチンラベル化された上記高分子を用いた場合も同様に、ビオチンはアビジンにより選択的に認識された。

②、③のポリアクリルアミド型人工糖質高分子および糖質系界面活性剤を用いた場合、レクチンによる選択的な認識は起こらず、非特異的な吸着をした。

④糖鎖結合型アルブミンを用いた場合、単独ではレクチンによる選択的な認識は起こらなかったが、BSA を共存させることにより選択的な認識を発現した。

以上より、糖鎖で MWCNT の表面修飾を行うためには、PVLA などの人工複合糖質高分子 (ポリスチレン骨格を持つ) を用いれば容易に達成できることが判明した。PVLA の結合は、PBS や H₂O での洗浄でははがれない程度に強く、また、PVLA は MWCNT の表面にチューブの形に添って密に配置している。MWCNT の表面の糖鎖は、相当するレクチンにより選択的に認識されるとともに、非特異的な吸着をブロックする働きを持

っていることが明らかとなった。これらのことより、糖鎖修飾 MWCNT が細胞を扱う条件下においても有用に機能する可能性が高いと考えられる。さらに MWCNT/糖鎖は、ナノチューブ表面へ糖鎖を密集させて結合させることができるので、糖鎖シグナルとしては増強（糖鎖のクラスター効果）されている利点が推測される。

ー アパタイトによる表面修飾 ー

生体親和性の化合物で MWCNT 表面の修飾を行うため、カルシウムイオンおよびリン酸イオン溶液中にて MWCNT からの析出させ、アパタイトによる表面修飾を検討した。その結果、MTR 社製および NanoLab 社製の両方で MWCNT からの析出物が観察された。

MWCNT の表面修飾法の一つとして、再結晶化を示すことができた。また、MWCNT の由来により結晶成長の形状が異なることが推測され、MWCNT 特有の性質として興味を持たれる。MWCNT をコアとした結晶成長は、アパタイト以外の結晶にも応用が可能であると考えられる。

今後、MWCNT コアとした結晶成長の再現性やアパタイト結晶の X 線回折や TEM 構造観察による構造解析を行う予定である。

MWCNT を生体親和性のある物質で修飾するため、擬似唾液を用いてアパタイトの析出による MWCNT の表面修飾を試みた。リン酸、カルシウム、フッ素のイオンを含む溶液に MWCNT を分散させ、2 週間 37℃にて静置した。その後、遠心・精製にて析出物を取り出し、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した結果、MWCNT 表面から放射状にアパタイトの析出が観察された。また、ナノチューブ直径の変化により、MWCNT コアとして析出したアパタイトの形態が異なることも明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1) ○赤坂 司、宇尾基弘、田路和幸、亘理文夫：人工複合糖質高分子によるカーボンナノチューブの表面修飾：第 24 回日本糖質学会年会 (横浜、2003 年 6 月 29 日～31 日)、同講演予稿集、p. 125、2003

2) ○赤坂 司、宇尾基弘、田路和幸、亘理文夫：人工複合糖質高分子によるカーボンナノチューブの表面修飾：第 42 回日本歯科理工学会学術講演会 (盛岡、2003 年 9 月 19 日～20 日)、歯科材料・器械、Vol22 (5)、p. 397、2003

3) ○赤坂 司、田村一央、亘理文夫：カーボンナノチューブを用いた培養基材の表面改質：第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (大阪、2003 年 12 月 16 日～17 日)、同講演予稿集、p. 215、2003

4) ○ Tsukasa Akasaka, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, Fumio Watari: Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition: The 26th Fullerene・Nanotubes General Symposium (Okazaki, January 7-9, 2004)、p. 165、2004

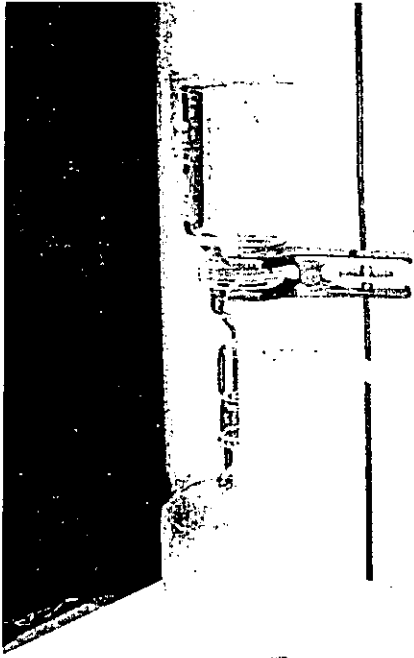


図1 吸引ろ過装置

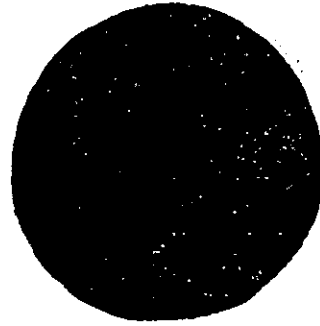


図2 MWCNT膜 (MWCNTのみ)

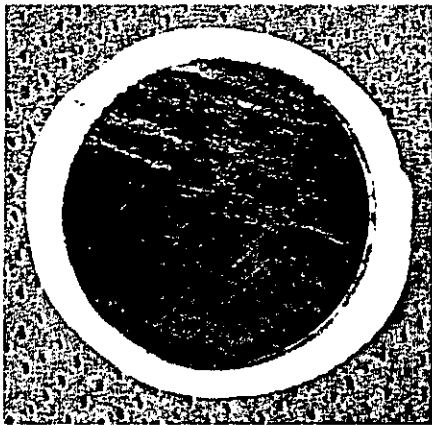


図3 MWCNT膜 (PC)

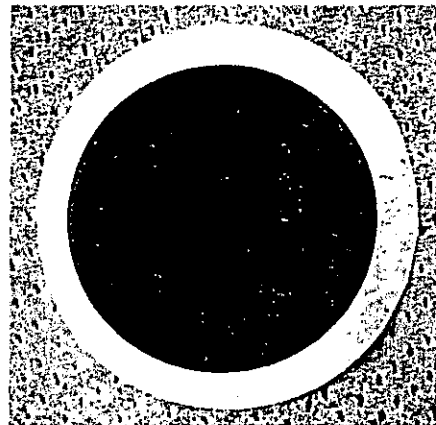


図4 MWCNT膜 (PTFE)

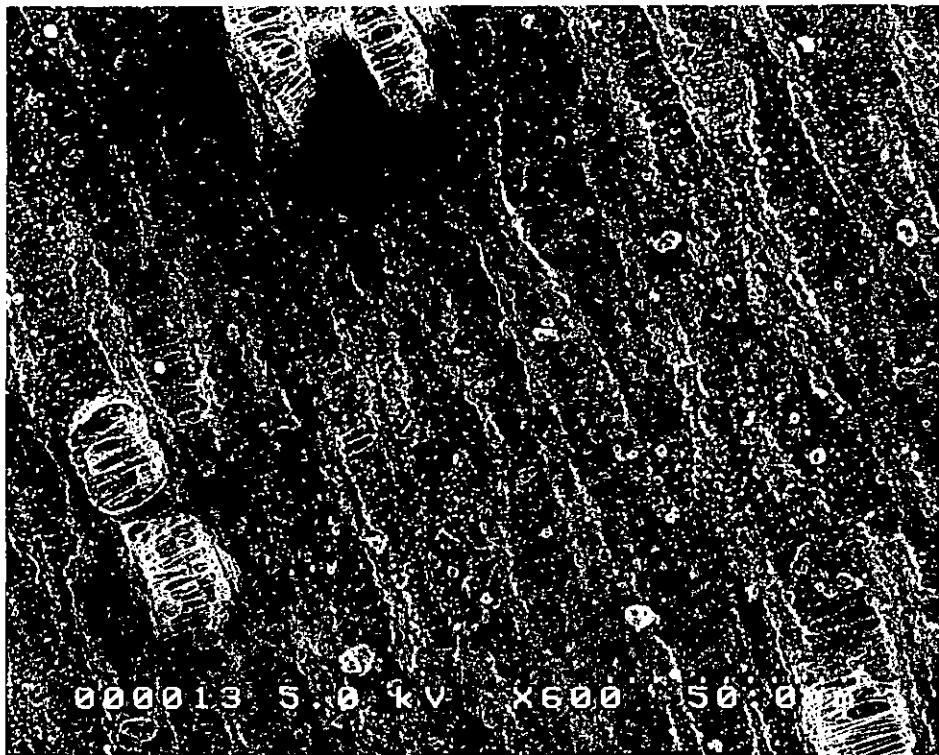


図5 PTFE膜上のMWCNTのSEM像

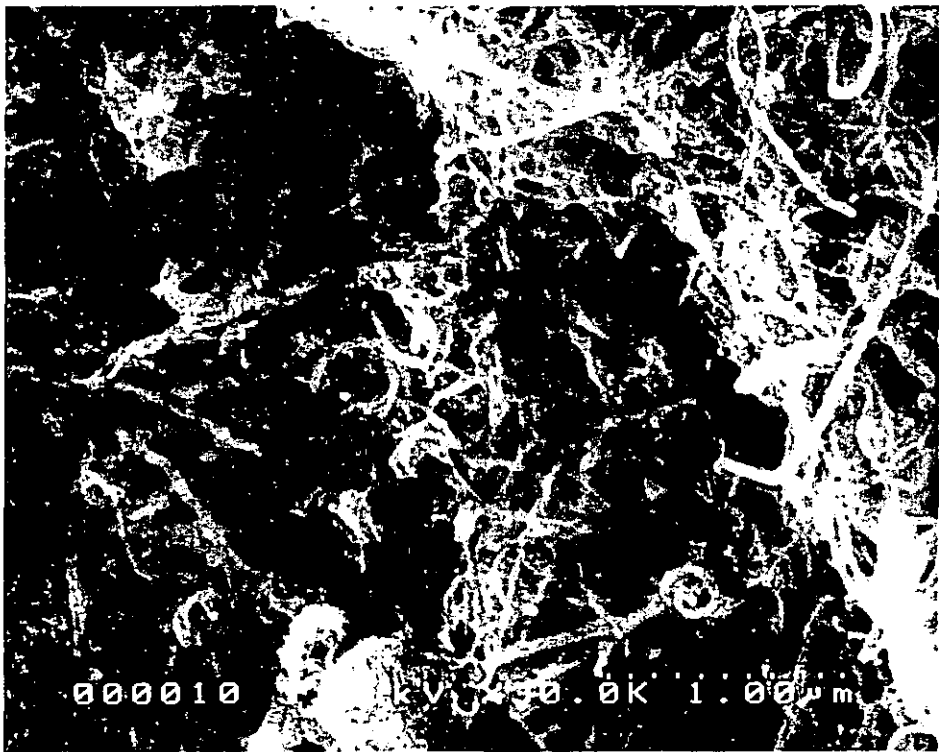


図6 PTFE膜上のMWCNTのSEM像(強拡大像)

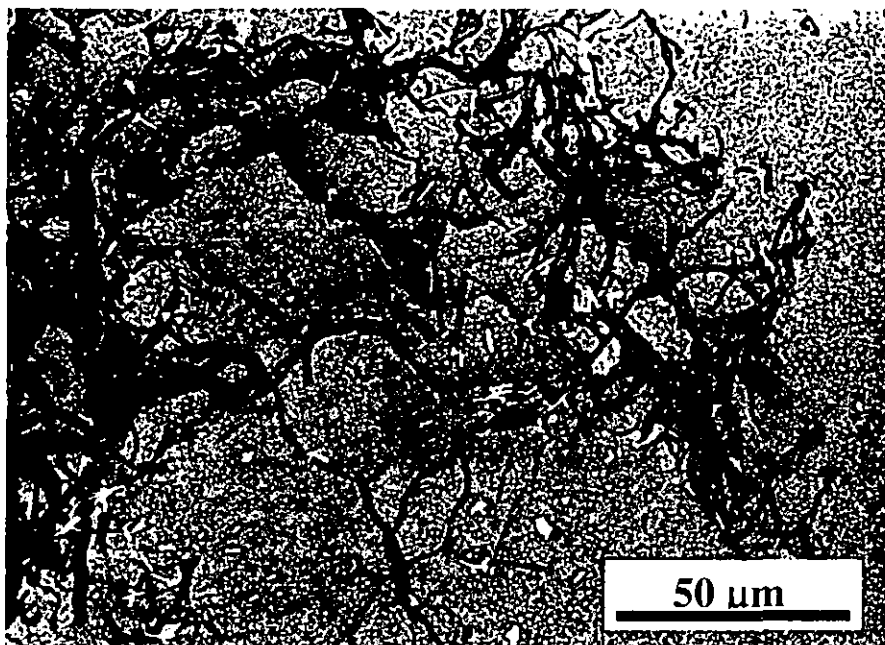


図7 MWCNT とコラーゲンの混合後の SEM 像

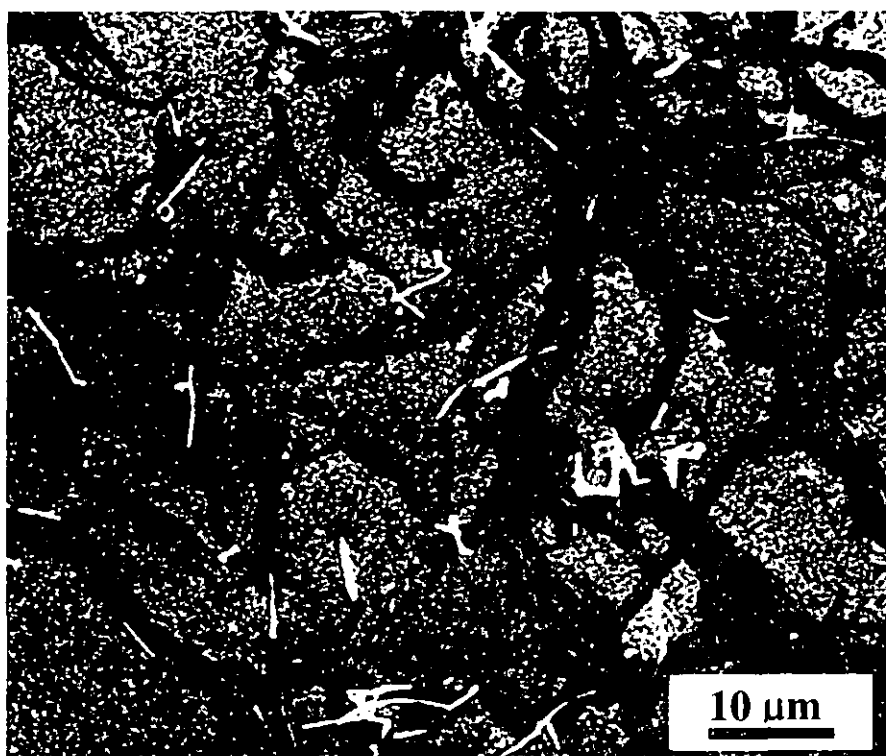


図8 MWCNT とコラーゲンの混合後の SEM 像 (強拡大像)

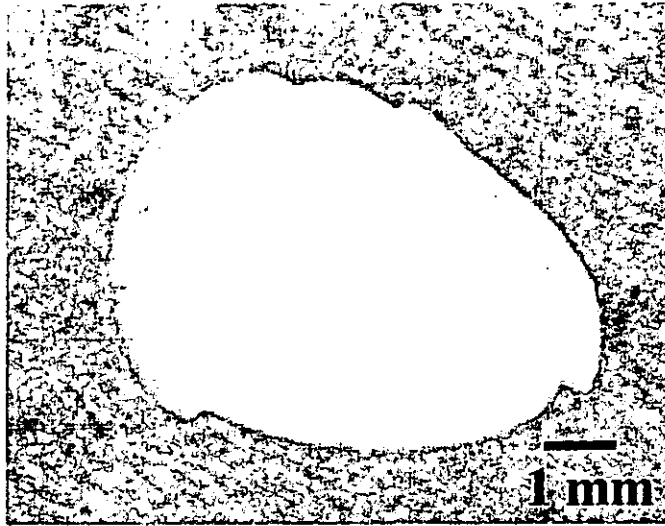


図9 酸処理5分後の歯質スライスの写真

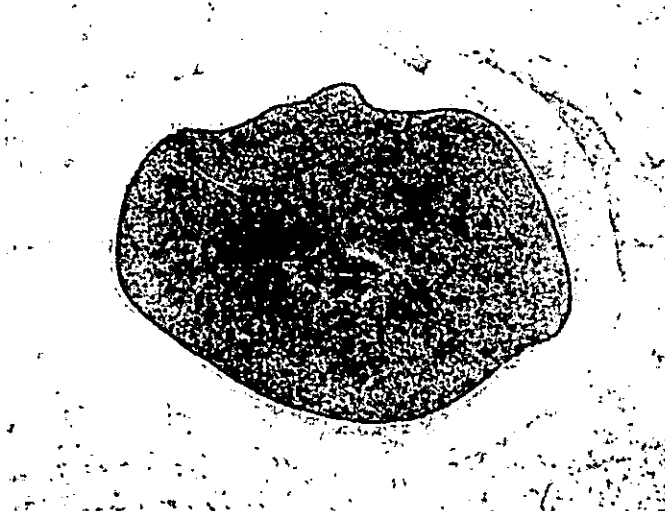


図10 酸処理1分、吸着30分後の歯質スライスの写真

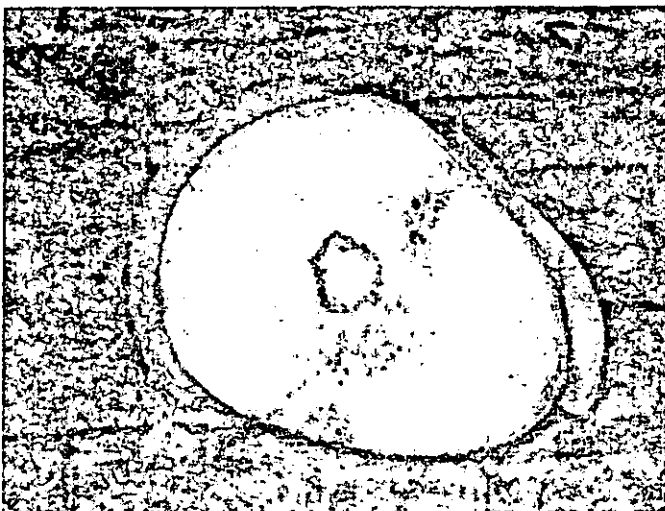


図11 酸処理5分、吸着10秒後の歯質スライスの写真

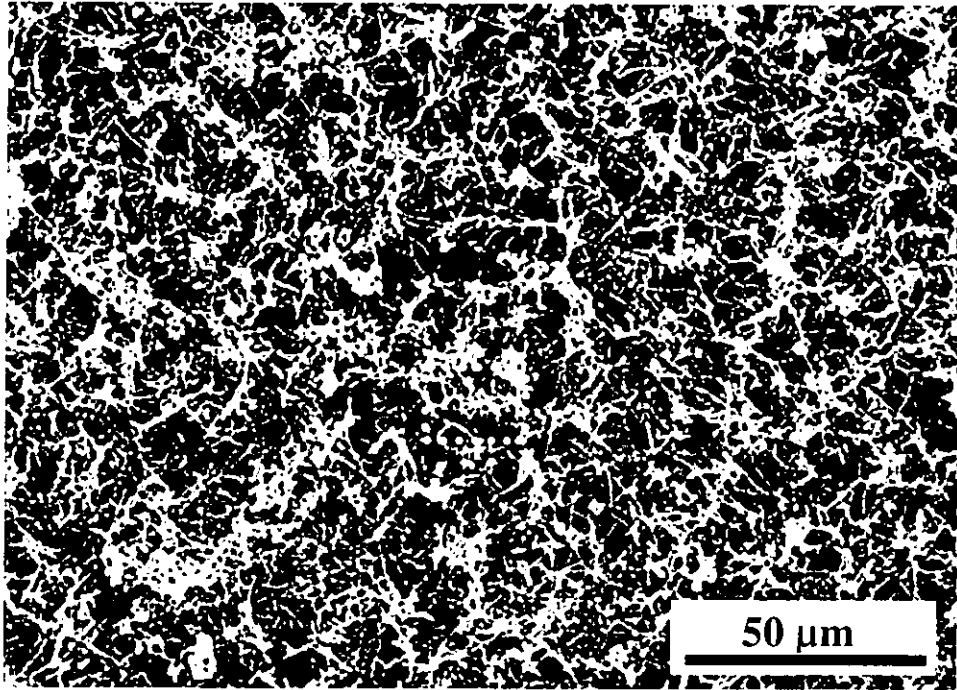


図12 酸処理1分、吸着30分後の象牙質のSEM像

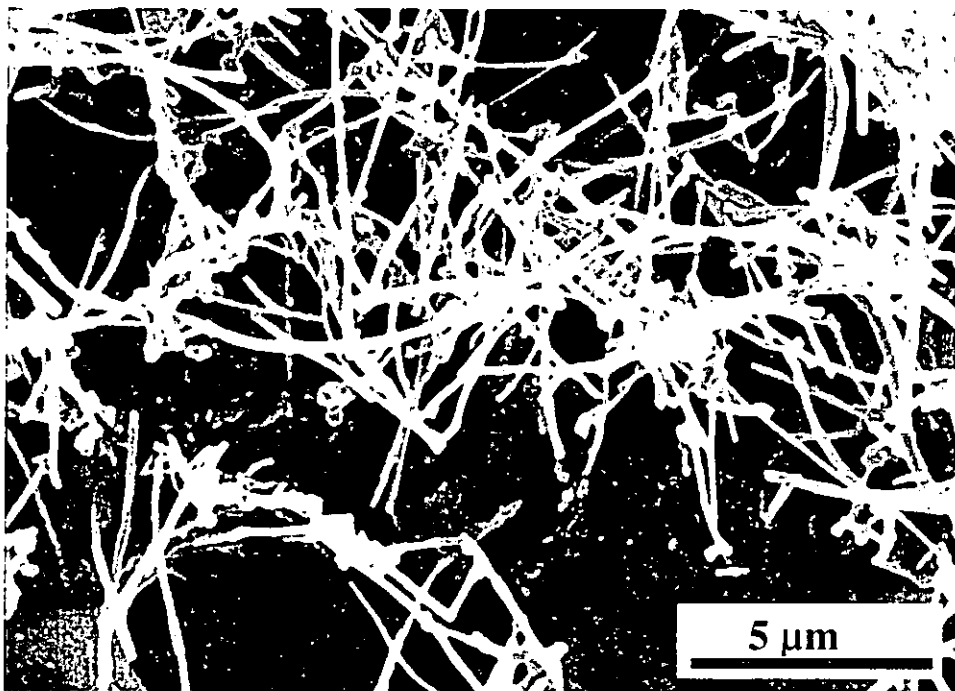


図13 酸処理1分、吸着30分後の象牙質のSEM像（強拡大像）

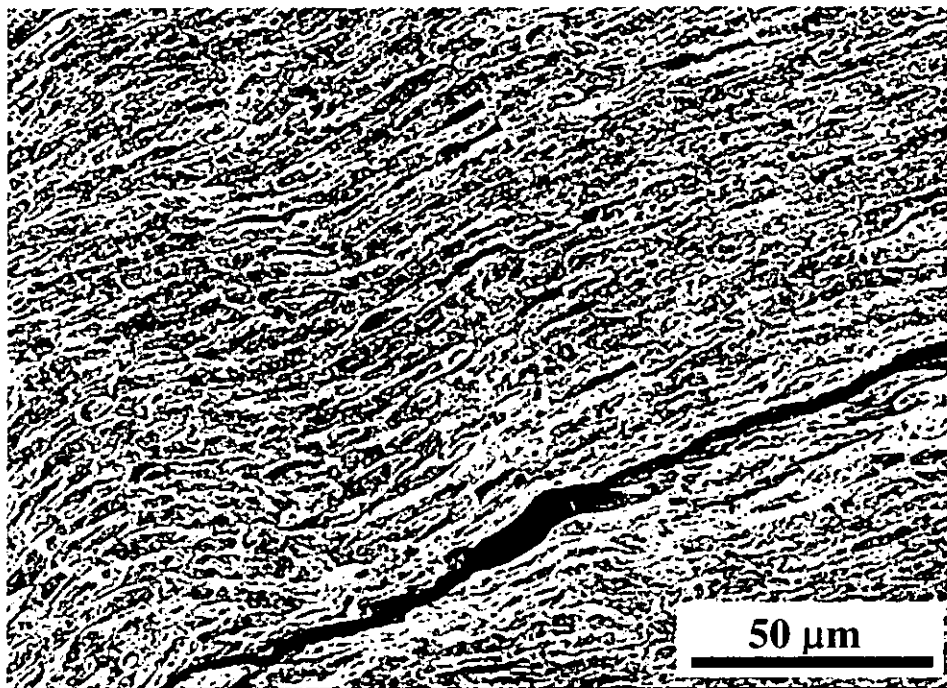


図14 酸処理1分、吸着30分後のエナメル SEM像



図15 酸処理1分、吸着30分後のエナメル SEM像 (強拡大像)

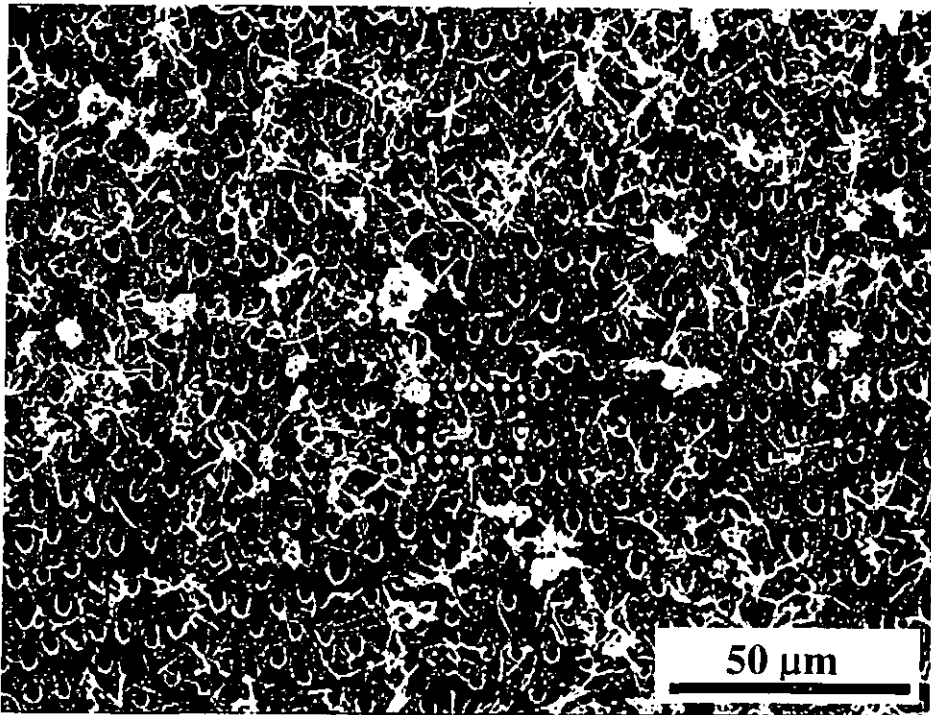


図16 酸処理5分、吸着10分後の象牙質のSEM像

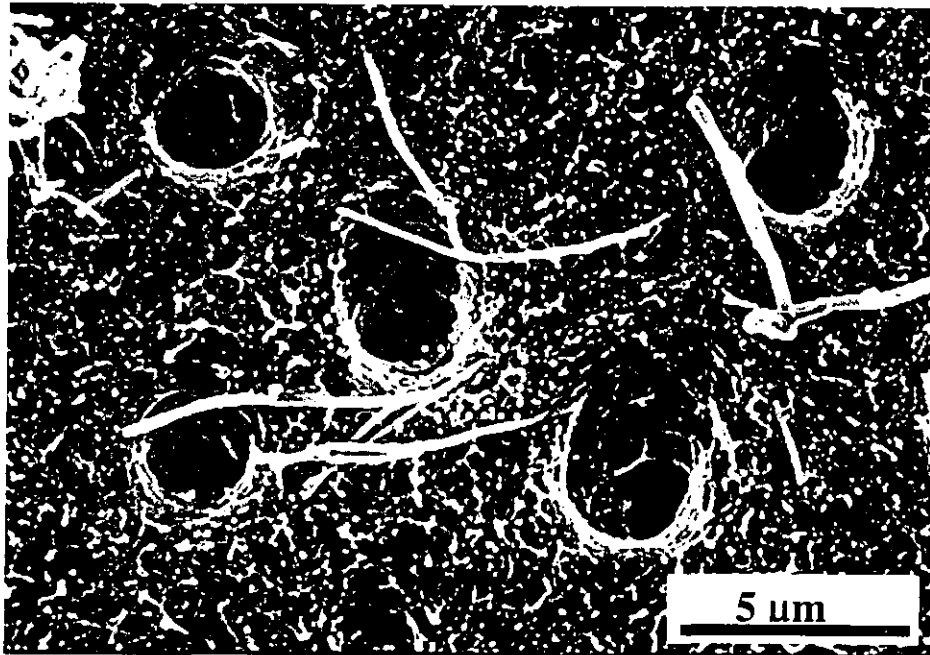


図17 酸処理5分、吸着10分後の象牙質のSEM像1 (強拡大)

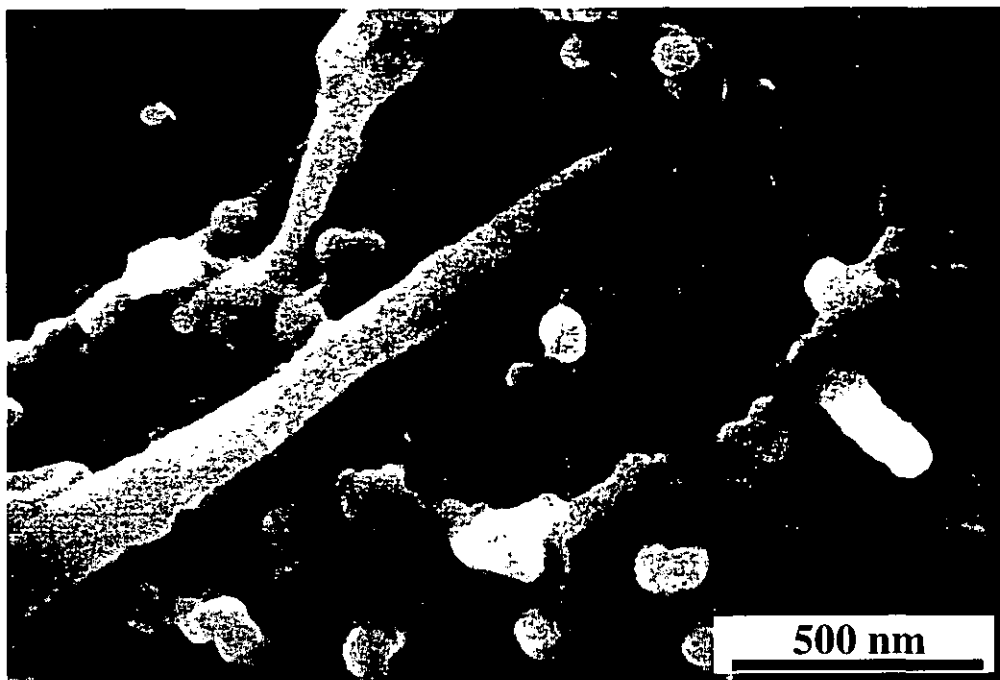


図18 酸処理5分、吸着10分後の象牙質のSEM像2（強拡大）

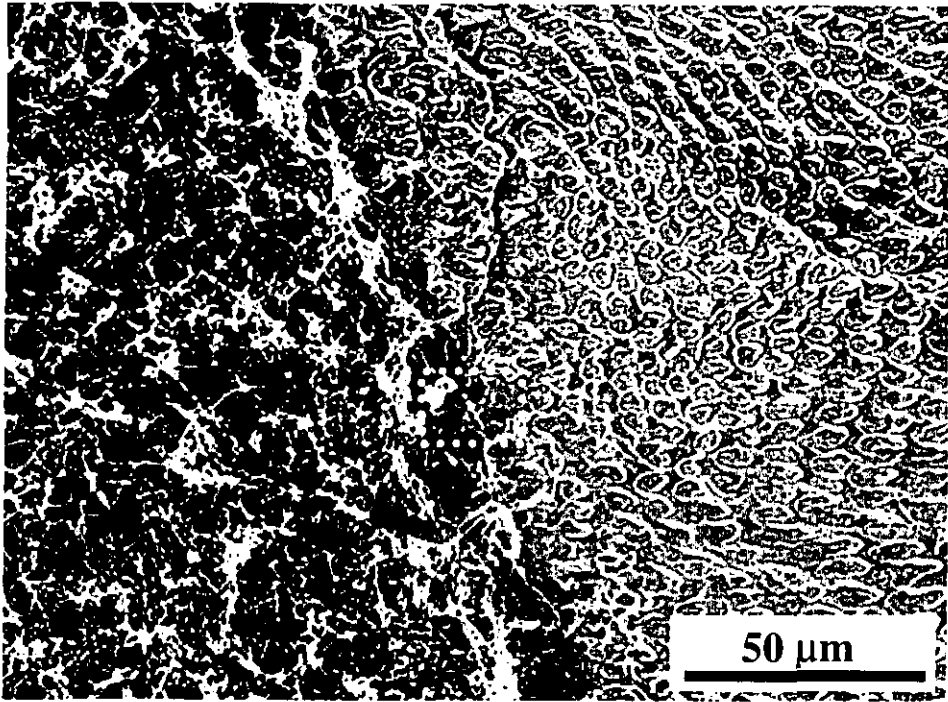


図19 酸処理5分、吸着10分後のエナメル-象牙質のSEM像

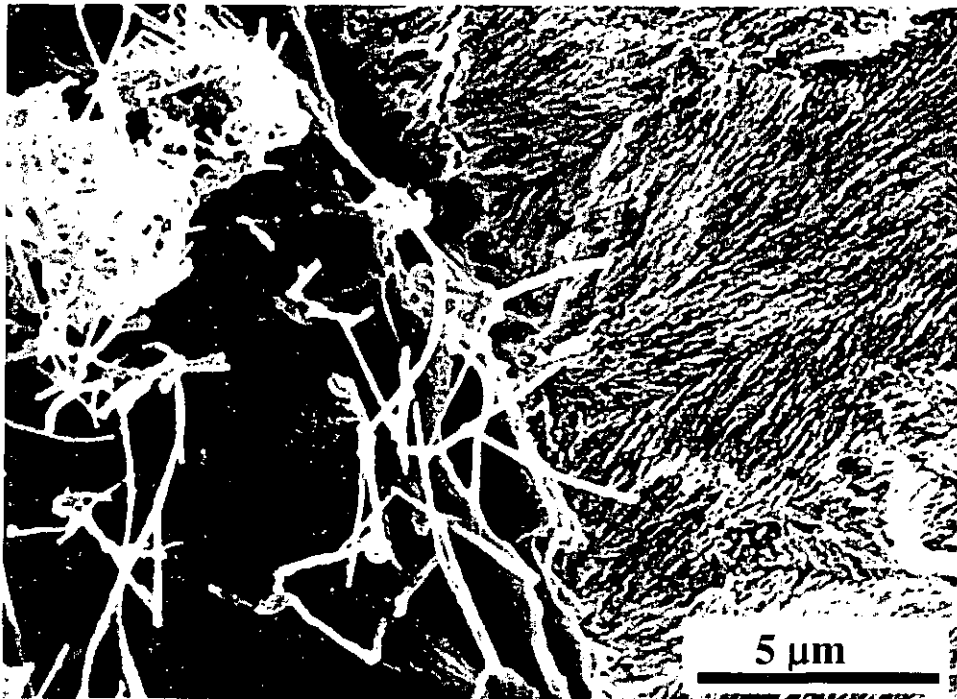


図20 酸処理5分、吸着10分後のエナメル-象牙質のSEM像(強拡大)

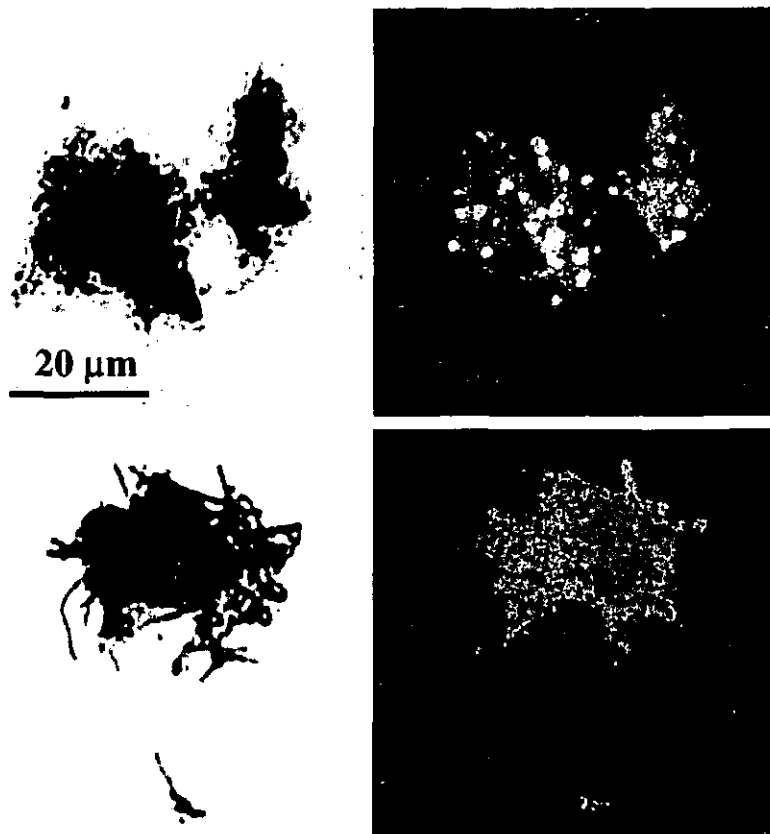


図 2 1 FITC-PVLA 処理後、MWCNT の CLSM 像
 (上段：NanoLab 社製、下段：MTR 社製、左：透過像、右：FITC 像)

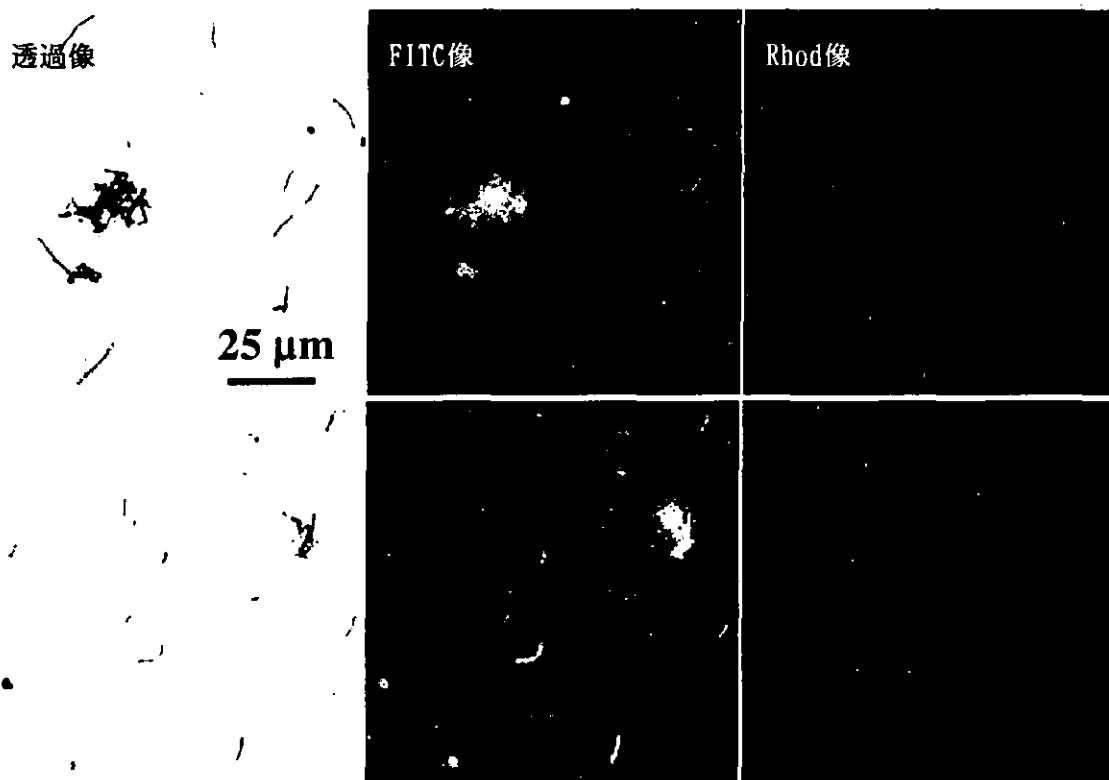


図 2 2 FITC-PVLA/MWCNT とレクチンの相互作用後の CLSM 像
 (上段：Rhod-RCA120、下段：Rhod-ConA、左：透過像、中：FITC 像、右：Rhod 像)

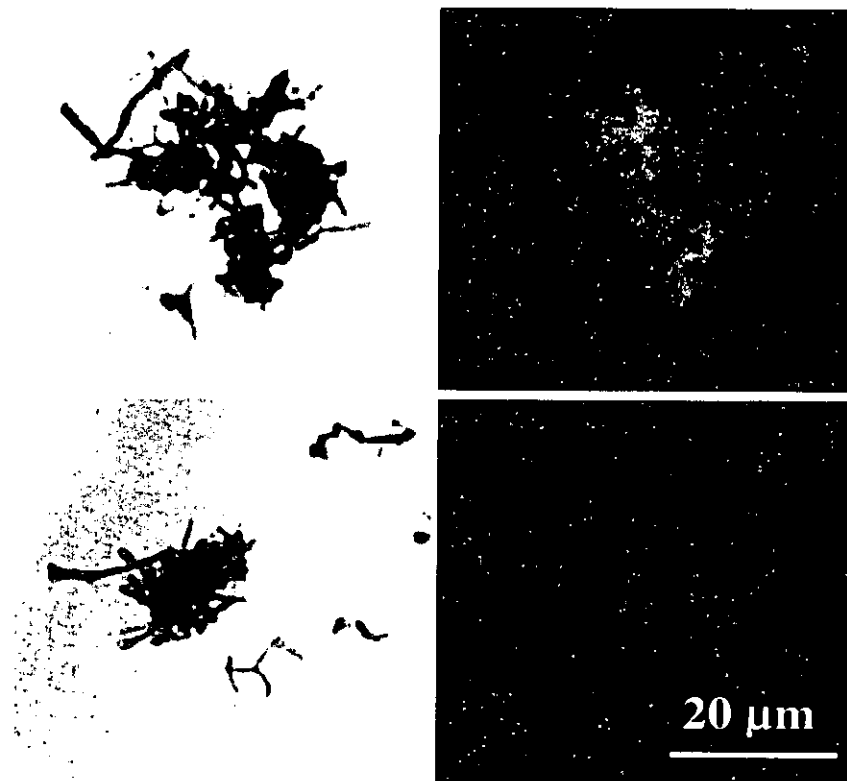


図 2 3 FITC-PVLA または FITC-PVCA/MWCNT とレクチンの相互作用の CLSM 像
 (上段 : PVLA、下段 : PVCA、左 : 透過像、右 : FITC 像)

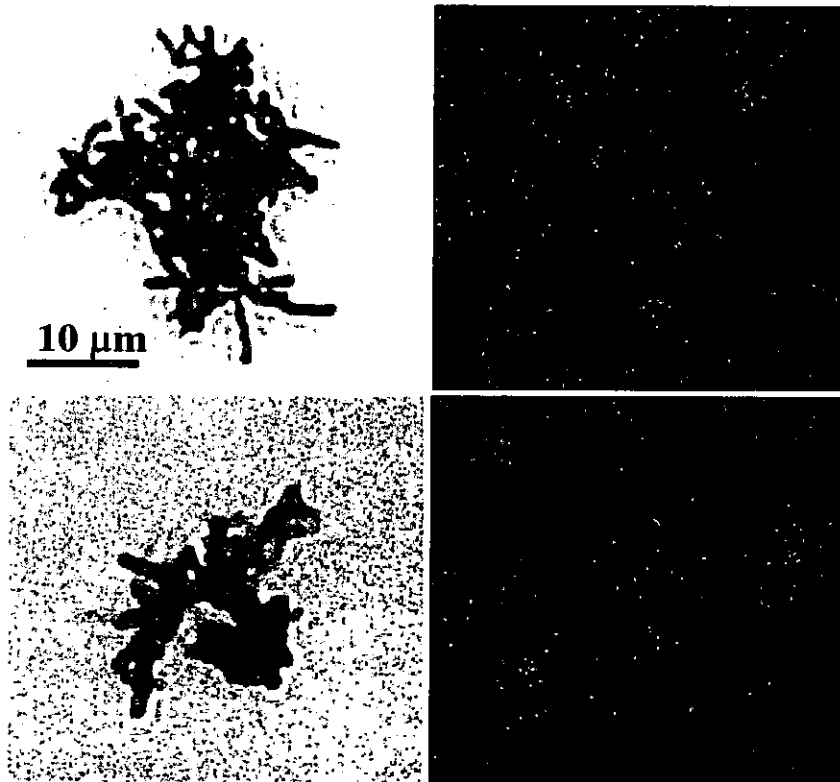


図 2 4 はだかの MWCNT とレクチンの相互作用の CLSM 像
 (上段 : Rhod-RCA120、下段 : Rhod-ConA、左 : 透過像、右 : Rhod 像)