

増加 ($p < 0.01$) した。また、その増加の程度は、550nm に比べて 220nm では大きな値を示した。

MC3T3-E1 細胞において同様の実験を行った。acid_cut_NL2_MW, ET_ozon_cut_NL2_MW もしくは acid_cut_CNF を、MC3T3-E1 細胞に添加し培養し、BrdU の取り込みを指標とした DNA 合成量 (Fig. 3) ならびに MTT 法 (Fig. 4) を用いて測定した生細胞数を、無添加のコントロールと比較したが、一致した結果は得られず、細胞増殖活性に対する影響は認められなかった。さらに、サイズ制御した NL2_MW を MC3T3-E1 細胞に添加し培養したが、いずれのサイズの MW でも、細胞増殖活性に影響を与えなかった (Figs. 3 and 4)。

D. 考察

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。本研究で用いたサイズ制御した 220nm, 550nm といったサイズのカーボンナノ分子は、何らかのメカニズムを介して、細胞の増殖活性に対して影響を与えうることを意味すると考えられた。正常な細胞の増殖の活性化は、細胞死の誘導と違って毒性には直接結びつくとは考えられないが、あるサイズのカーボンナノファイバー粒子は、細胞に対して何らかの機構を介して、その細胞内シグナル伝達機構を活性化しうる可能性が考えられた。また、その作用が C2C12 細胞と MC3T3-E1 細胞において異なることから、細胞の種類によって特異的である可能性が考えられた。

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ファイバーは可溶化処理をしており、水懸濁状態

で水に対して分散化させているが、完全な可溶性分子ではない。

可能性としてまず考えられるのは、サイズ制御された 220nm といった微細な粒子の細胞に対する刺激性である。物理的な刺激を細胞がどのように受容するのかその機序は明らかではないが、その受容機構の細胞特異性が、本研究で見られた C2C12 細胞と MC3T3-E1 細胞における反応性の違いをもたらした可能性が考えられる。

第二に微粒子のエンドサイトーシスによる可能性が挙げられる。一般に細胞は大きさの小さい不溶性分子を非自己すなわち異物として認識し、それらの分子を細胞の異物認識機構によりエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれることが知られている。エンドサイトーシスには、受容体を介する receptor-mediated の機構と受容体を介さない receptor-independent の 2 つの機構がある。一般的にスカベンジャーとして異物処理を担い貧食作用を有するマクロファージ等では、その作用の阻害剤として cytocharasin B が用いられている。マウス腹腔マクロファージにポリエチレン粒子を貧食させると、マクロファージ活性化が報告されるとの報告もある。積極的な貧食作用を有するマクロファージと本研究で用いた筋芽細胞や骨芽細胞とは、異物処理といった機能は異なるものと考えられる。本研究で用いたサイズが小さいナノファイバーが、細胞でエンドサイトーシスされるのか、それは細胞特異性が存在するか、またそれによって細胞へ対する機能に何らかの影響を及ぼし得るかといった問題に対して、現在さらに詳細な機構に関し研究を進行中である。

E. 結論

acid_cut_NL2_MW, ET_ozon_cut_NL2_MW のカーボンナノチューブならびに acid_cut カーボンナノファイバーは、C2C12 細胞と MC3T3-E1 細胞の細胞増殖活性に影響を及ぼ

さなかつた. ac_size_550nm_NL2_MW もしくは ac_size_220nm_NL2_MW については, C2C12 細胞において細胞増殖活性が増加した. しかし, MC3T3-E1 細胞では変化せず, 細胞特異性が存在する可能性が示唆された.

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

1. 学会発表

田村正人, 田路和幸, 古月文志, 鈴木豊典,
戸塚靖則

多層カーボンナノチューブの骨芽細胞なら
びに筋芽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」

第3回研究発表会, 松島(宮城)平成15年9
月9日

衣斐美歩, 秋本結輝, 佐藤義倫, 田路和幸,
川崎貴生, 田村正人

カーボンナノチューブの骨芽細胞ならびに
筋芽細胞培養系における細胞増殖活性と細
胞機能に及ぼす影響

「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」

第4回研究発表会, 登別(北海道)平成16
年2月20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

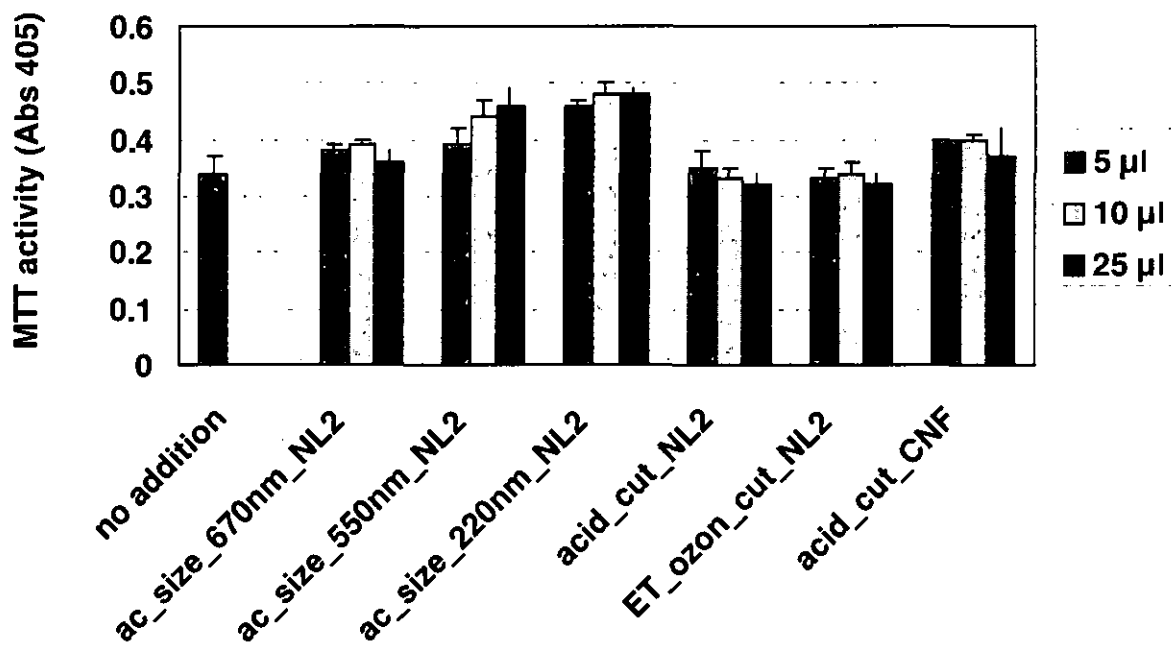


Fig. 1. Effects of carbon NL or NF on cell viabilities in C2C12 cells on culture

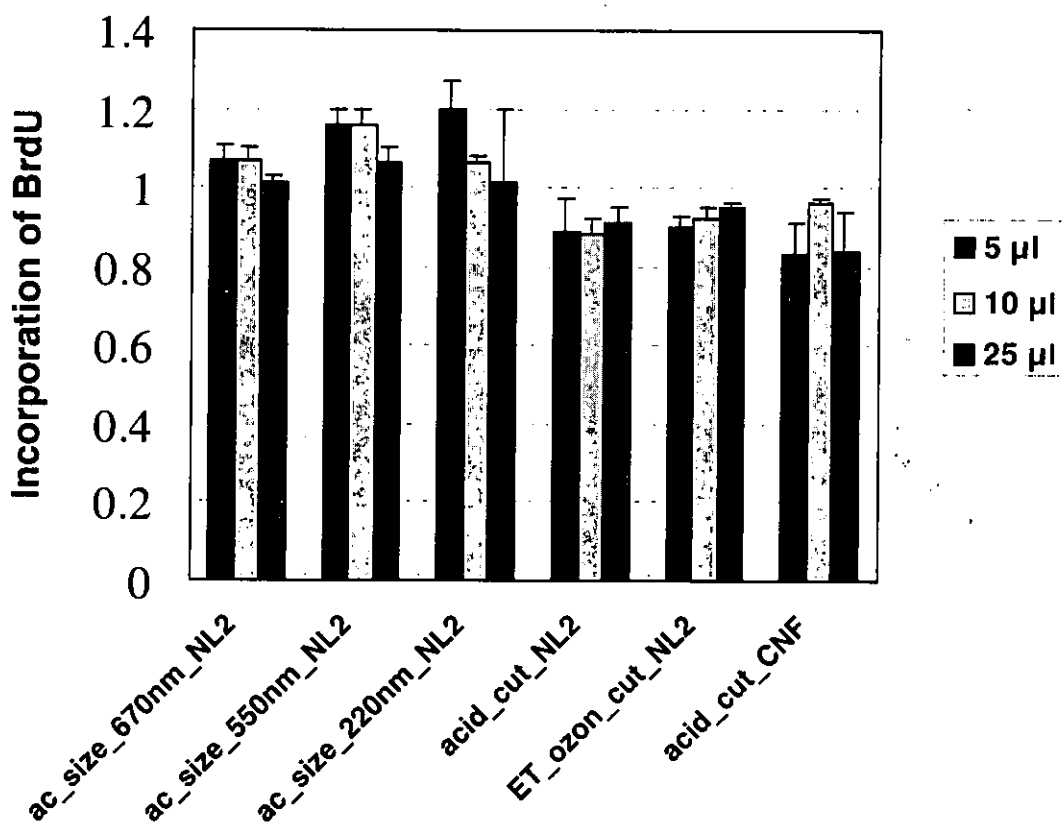


Fig. 2. Effects of carbon NL or NF on DNA synthesis in C2C12 cells on culture

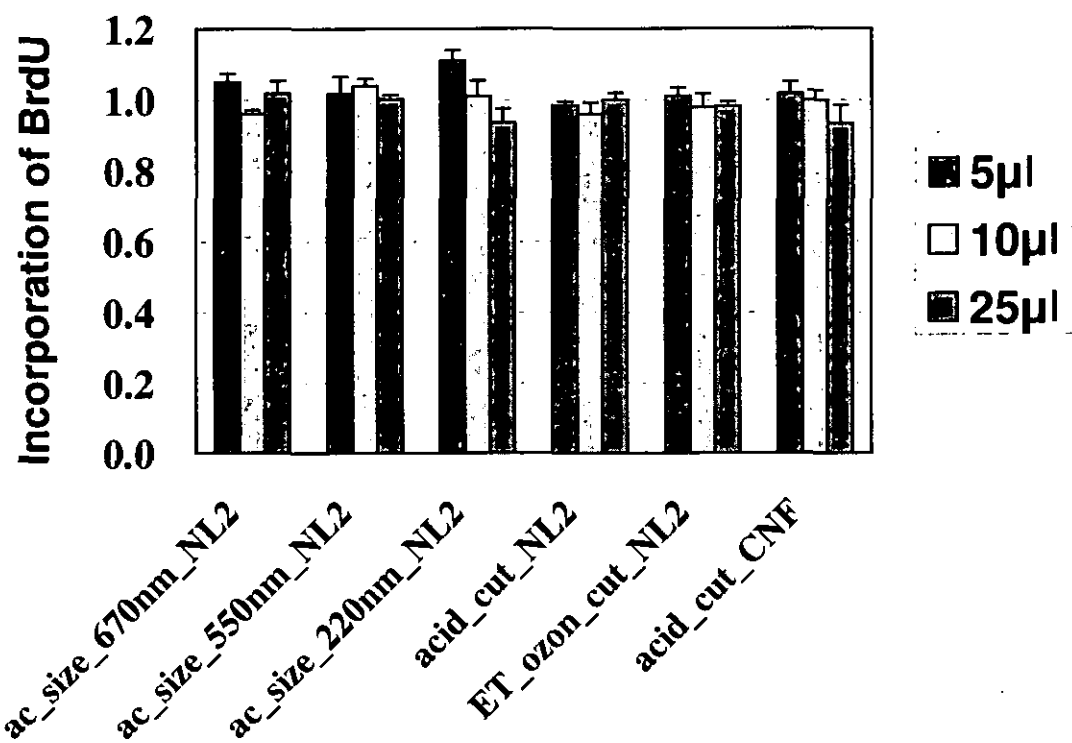


Fig. 3. Effects of carbon NL or NF on DNA synthesis in MC3T3-E1 cells on culture

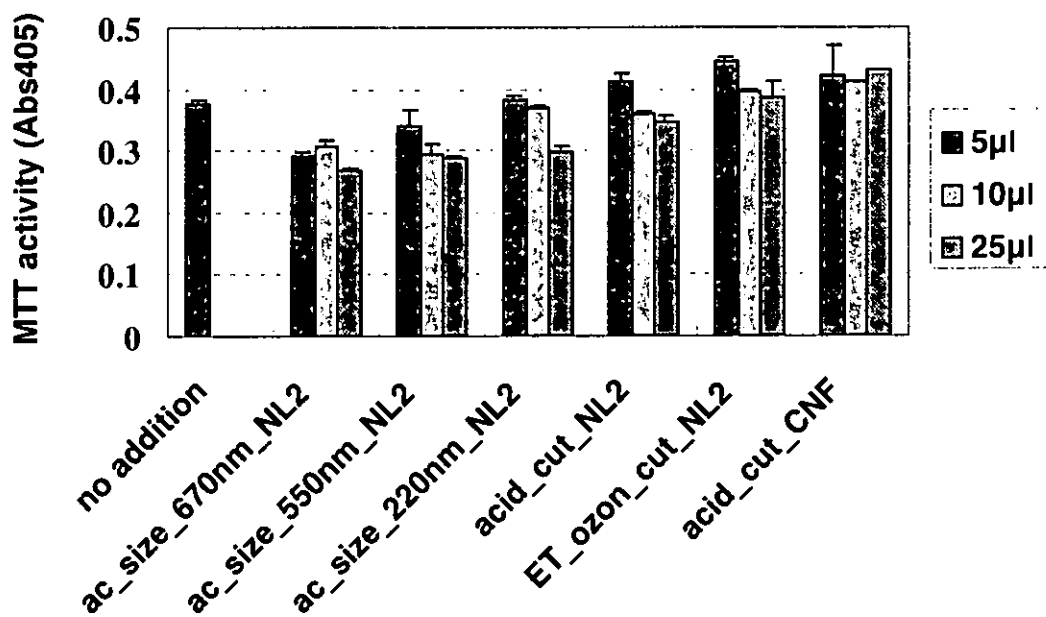


Fig. 4. Effects of carbon NL or NF on cell viabilities in MC3T3-E1 cells on cultur

分担研究報告書

カーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウムコンポジットコロイド:
特性および生体適合性の研究とバイオテクノロジー応用

主任研究者	亙理 文夫	北海道大学歯学研究科
研究協力者	古月 文志	北海道大学地球環境科学研究科
	野田坂 佳伸	北海道大学歯学研究科
	清水 恭子	株式会社 ホクドー
	柴 肇一	富士レビオ株式会社
	進藤 正信	北海道大学歯学研究科
	柴田 健一郎	北海道大学歯学研究科
	佐藤 義倫	東北大学工学研究科
	田路 和幸	東北大学工学研究科

研究要旨 アルギン酸ナトリウム水溶液中でカーボンナノファイバーを分散することによって親水性コロイドを得た。この方法では再現性良くカーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウム(CNFs/Na-ALG)コロイドを作製することができた、かつ初めての例である。カーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウムコロイドの親水性領域の情報は SEM、TEM イメージ、ゼータポテンシャル分析、スペクトル測定により得た。CNFs/Na-ALG コロイドの生体系に対する毒性は、*in vivo*- や *in vitro*-の検討中では観察されなかった。また、遺伝子導入への応用として CNFs/Na-ALG 複合体の有効性が、pCMV β -Gal 発現プラスミドの H1299 肺ガン細胞株への輸送により示された。

A. Introduction

The procedure of dispersing carbon nanofibers (CNFs) and/or carbon nanotubes (CNTs) into aqueous solutions is one of the most important steps towards achieving the goal of introduction of this fascinating new class of materials to clinical, food, and the other biologically relevant fields. The so-called side-wall functionalization¹⁻² and the polymer-molecular wrapping techniques³⁻⁷ are

the methods, being used frequently, for dispersing CNFs and/or CNTs. The resultant products obtained with these methods, however, may not be as biocompatible as would be desirable.

Here we report a completely new yet highly effective approach to dispersing CNFs in to aqueous solutions by using alginate as the dispersing agent. Alginate is a non-toxic, naturally occurring linear polysaccharide,

found widely in brown seaweed. Its wound healing efficacies, immunoadjuvant effects, together with its gelling properties have generated a great number of clinical, food, and the other biotechnological applications.⁸ Our dispersing approach based on alginate provides advantages over the previous methods 1) that a large amount, full-length, pristine forms of CNFs can be dispersed in to aqueous solutions in a single step with a very simple manipulation procedure, 2) that the resultant products, i.e., the CNFs/alginate colloids are highly desirable for clinical, medical, and the other biotechnologically relevant operations, and 3) that the CNFs/sodium-alginate colloids can be rearranged in to films, fibres, beads, at will, providing a practical approach to use of these nano-sized materials for macro-scaled applications.

B. Experimental

B.1 CNFs synthesizing Carbon nanofibers used through out this study were prepared in the laboratory using the method of chemical vapour deposition (CVD).⁹ Powdered Ni catalysts were firstly placed onto a Al₂O₃ plate; this Ni/Al₂O₃ plate carrying the powdered Ni catalysts was positioned in a quartz tube located in a horizontal tube furnace and was then reduced in a 10% hydrogen/helium stream for about two hours at 873 K. The CNFs growing was accomplished through the decomposition of ethylene (C₂H₄/H₂ = 4:1) for 4h-reaction at atmospheric pressure at 873 K. Soots, the thermal CVD products (approximately 100 mg), were treated with 6.0 M HCl in a reflux attached flask for about 12

hours at 373 K, in an effort to dissolve the metal catalysts. The suspensions were passed through two stacked polycarbonate filters of 0.1 µm pore size using a high-pressure vesicle extruder. The solid cake was rinsed thoroughly with deionized water and was then dried for at least than 24 hours at 333 K. Purity of the resultant CNFs was found to be better than 99%; diameter and the length were in ranges 50-300 nm, and 2-15 µm, respectively. Figure 1 shows the SEM image (upper photo) and TEM image (lower photo) of the resultant CNFs. Platelet CNFs in which the 002 planes are piled up along the fiber axis direction together with the herringbone CNFs in which the 002 planes are distributed on the two sides at an angle with respect towards the fiber axis were observed.

B.2 CNFs/alginate colloids preparation and characteristic studies

Sodium alginate (viscosity and pH of an aqueous solution containing 10 mg/ml of sodium alginate at 20 °C was found to be 300 – 400 cP and 6.0 – 8.0, respectively) used throughout this study was obtained from Wako Chemical Industries (Osaka, Japan). Sodium alginate was dissolved in deionized water to prepare aqueous sodium alginate (Na-ALG) solutions. Small amounts of CNFs were added in to the aqueous Na-ALG solutions and were then well-mixed by a combination of high-shear mixing and sufficient ultra-sonication. Thirty millilitres of each the black dispersions were placed in a 50-ml centrifuging tube and were centrifuged at 4000 rpm for 30 min; black precipitations separating from the aqueous solutions were not observed. CNFs/alginate colloids with high uniformity were obtainable up to a

concentration of 1.0 mg/ml of CNFs by using an aqueous solutions having 10 mg/ml sodium alginate as the dispersing solution.

Uniformity of the CNFs/Na-ALG colloid solutions was measured by calculating the linearity of the calibration curve of CNFs in the CNFs/sodium-alginate (CNFs/Na-ALG) colloid solution using UV-vis as the detection. The characteristic absorption derived from the CNFs dispersion is seen at around a range wavelength 220 - 500 nm (Fig. 2). The linearity, r^2 , of the calibration curves of CNFs in the CNFs/Na-ALG colloid solution at 260 nm, was found to be 0.9989; demonstrating the high uniformity of the CNFs/Na-ALG colloid solution. Samples used for deriving the calibration curves were the aqueous Na-AGL solutions each containing 0, 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{g/ml}$ of CNFs with the concentration of Na-ALG in each sample being fixed at 10 mg/ml. The stability of the CNFs/Na-ALG colloids was measured by calculating the concentration of CNFs versus the sediment time, the similar method as reported by Jiang and co-workers.¹⁰ No changes in CNFs concentrations were observed up prolonged two-week standing at room temperature.

Zeta potentials of the CNFs/Na-ALG colloids are the other essential parameters determining the stability of the colloid solutions. An aqueous CNFs/Na-ALG colloid solution containing 50 μg CNFs and 10 mg Na-ALG was prepared and analysed using an electrophoretic light scattering spectrophotometer (ELS-8000, Otsuka Electronics) for the zeta potential measurement. Zeta potential values, ζ , are calculated from the

particle velocities based on the Helmholtz-Smoluchowski equation ($\zeta = 4\pi\mu\eta/D$, where, μ , η , and D are representing the electrophoretic mobility, viscosity, and the dielectric constant of the liquid in the boundary layer, respectively).¹¹ As can be seen from the ζ vs. pH plots (Fig. 3), the maximum ζ value of the CNFs/Na-ALG colloids is as high as -58.03 mV; this again shows the high stability of the CNFs/Na-ALG colloids. The ζ vs. pH plots (Fig. 3) for the CNFs/Na-ALG colloids and that for the aqueous solution containing Na-ALG alone were virtually identical, indicating the zeta potentials of the CNFs/Na-ALG colloids are dominated by alginate ions. Decrease in the absolute value of ζ is seen for both samples as the pH decreased (pH of the two samples were adjusted using 1.0 M HCl) for all pH values studies; this implies fact that alginate has adsorbed onto the CNFs throughout the entire pH range. Electrostatic repulsions occurring between the carboxylate groups of the alginate ions those are adsorbed considerably on the surfaces of CNFs have diminished van der Waals attractions occurring among the CNFs, as a result, the CNFs/Na-ALG colloid solutions are being high stabilized.

Sodium alginate is a linear, water-soluble anionic polymer of sodium D-mannuronate and/or L-guluronate units. Figure 4 shows the structural segment of sodium alginate along with the conformations of sodium mannuronate and sodium guluronate. D-mannuronate units are connected by β (1 \rightarrow 4) linkages, and the L-guluronate units are connected by (1 \rightarrow 4) linkages, presumably in the α configuration in

alginate. FT-IR spectra of CNFs, alginate, and the CNFs/alginate complexes (Fig. 5) were measured in an effort to elucidate the adsorption mechanism of alginate on to CNFs. Typical characteristic bands of alginate are (i) 1627 and 1419 cm^{-1} (the characteristics bands of carboxylate), (ii) 808 cm^{-1} (the characteristics band of mannuronate) and/or 787 cm^{-1} (the characteristics band of guluronate), and (iii) 940 cm^{-1} (the characteristics band of α 1 \rightarrow 4 linkage), and 904 cm^{-1} (the characteristics band of α -L-gulopyranuronic ring). The characteristics bands of carboxylate of alginate for the CNFs/Na-ALG sample shift from 1627.63, 1419.35 in the reference alginate sample to 1613.16, and 1413.57 cm^{-1} , respectively, in the CNFs/Na-alginate sample. The characteristics band of α 1 \rightarrow 4 linkage and the characteristics band of α -L-gulopyranuronic ring of alginate for the CNFs/Na-ALG sample shift from 947.84 and 890.95 in the reference alginate sample to 943.98 and 887.8 cm^{-1} , respectively, in the CNFs/Na-alginate sample. These shifts in the characteristic bands for the CNFs/Na-ALG sample are the signs of the interactions occurring along the alginate molecules and the CNFs. On the other hand, the characteristic band of mannuronate for the CNFs/Na-ALG sample shifts from 811.88 in the reference alginate sample to 814.77 cm^{-1} . This increase of the mannuronate band is the sign indicating a fact that the sugar bone of alginate are the key-groups dominating the alginate absorption on to the CNFs. The characteristic band of guluronate was much smaller than that for mannuronate, indicating alginate that used for

this study is built up mainly by mannuronate.

B.3 Biocompatibility studies, in-vivo and in-vitro tests

Eight-week-old Jcl:SD rats were purchased from Clea Japan, Inc. Animals were quarantined and acclimatized for six days, and 5 males were distributed randomly into 3 groups, as described in Table 1.

CNFs-Na-AGL aqueous colloids containing 0.1 mg/ml CNFs and 2.0 mg/ml sodium alginate and the vehicle control containing 2.0 mg/ml sodium alginate alone were prepared and were used for the biocompatibility studies. Both the vehicle-control and the CNFs/Na-AGL aqueous colloids were single dosed orally using a stomach tube. The dose volume was 10 ml/kg for CNFs for body weight. Gross observations and body weights were recorded weekly. At the term of observation, animals were starved for 16 hours, anesthetized, then, blood and serum samples were collected, and necropsied. Table 2 shows the results of hematological examinations and biochemical analysis. At one-week after the administration, the animal given with the CNFs/Na-AGL colloids showed decrease of WBC counts. This change in WBC is attributed considerably to cellular immune response against the CNFs, because no other infectious signs or anemia were observed. Increase of β -globulin fraction and deep plica of the glandular stomach were observed at one-week after the administration of either the CNFs/Na-ALG colloids or the vehicle control solution. These signs shows facts that the change of WBC and thereby the β -globulin fraction is caused essentially by the vehicle control, i.e., sodium alginate. All rats have recovered after three weeks of the

administration. Clinical signs or acute toxic signs were not observed in all animals through the study. Changes on the other parameters were not observed. We can conclude based on these in-vivo experimental data that the dispersed CNFs prepared using sodium alginate as the dispersing agent have no or very little detrimental impacts to the animals examined in this study.

B.4 Biotechnical applications The CNFs/Na-ALG complexes were employed for delivering pCMV β -Gal expression plasmids into H1299, a lung carcinoma cell line. The capability of CNFs for transgenic applications was demonstrated.

References

1. W. Zhao, C. Song, P. E. Pehrsson, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5348 (2002).
2. V. Georgakilas, N. Tagmatarchis, D. Pantarotto, A. Bianco, J.-P. Briand, JM. Prato, *Chem. Comm.*, 3050 (2002)
3. M. J. O'Connell, P. Boul, L. M. Ericson, C. Huffman, Y. Wang, E. Haroz, C. Kuper, J. Tour, K. D. Ausman, R. E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.*, 342, 265(2001).
4. G. I. Dovbeshko, O. P. Repnytska, E. D. Obraztsova, Y. V. Shtogun, *Chem. Phys. Lett.*, 372, 432 (2003).
5. A. Star, D. W. Steurman, J. R. Heath, J. F. Stoddart *Angew. Chem. Int. Ed.*, 14, 41(2002).
6. R. Bandypoadhyaya, E. Native-Roth, O. Regev, R. Yerushalmi-Rozen, *Nano Lett.*, 2, 25(2002).
7. N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai, K. Yoshikawa, *Chem. Lett.*, 32, 456 (2003).
8. The Merck Index, Eleventh ed., p. 232, 1989.
9. N. M. Rodriguez, *J. Mater. Research*, 8, 3233 (1996).
10. L. Jiang, L. Gao, J. Sun, *J. Colloid and Interface Sci.*, 260, 89 (2003).
11. H. E. Ries, *Nature*, 226, 72 (1970).

Acknowledgment

This study was partly supported by Grant-in-Aid for Research on Nano-medicine #H14-nano-021 from the Ministry of Health, Labor and Welfare.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Bunshi Fugetsu, Shuya Sato, Yoshinobu Nodasaka, Toshikazu Shiba, Masanobu Shindoh, Shunitz Tanaka, Norio Nishi, Fumio Watari: Preparation of Water-Soluble Carbon Nanotubes/Fibers for Medical, Food, and the Other Biotechnological Operations by Using Polysaccharides as the Solubilization Agent. 第26回フラーレン・ナノチューブシンポジウム 名古屋 2004年1月

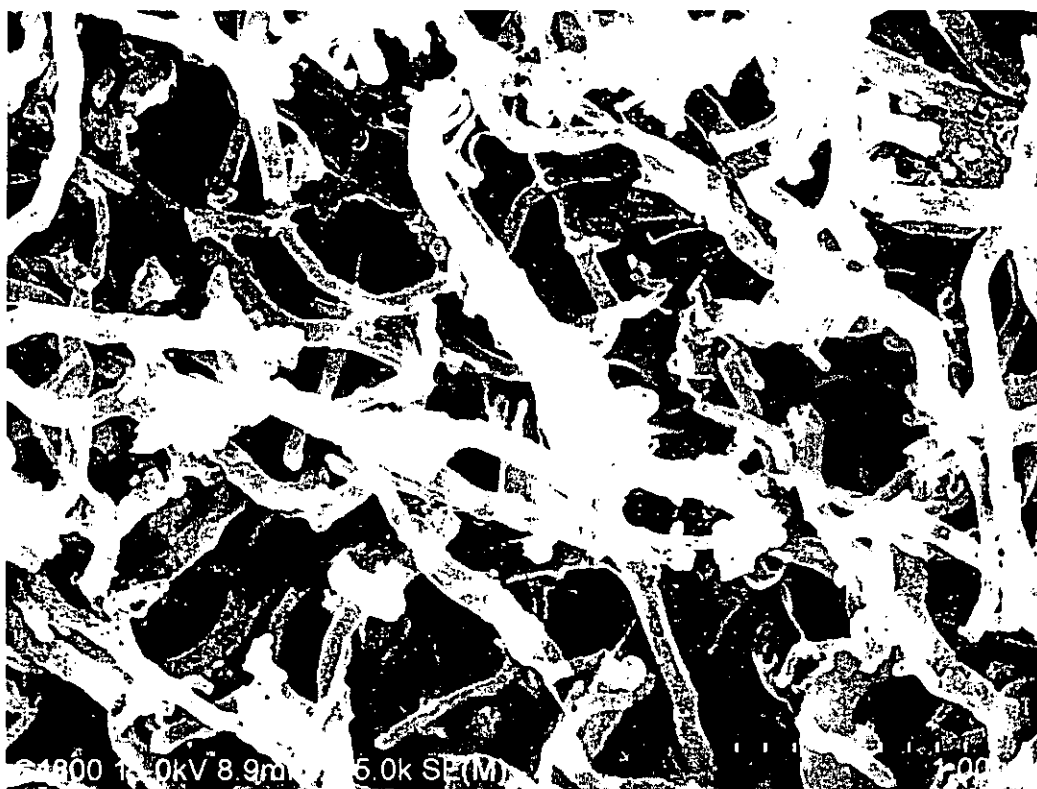
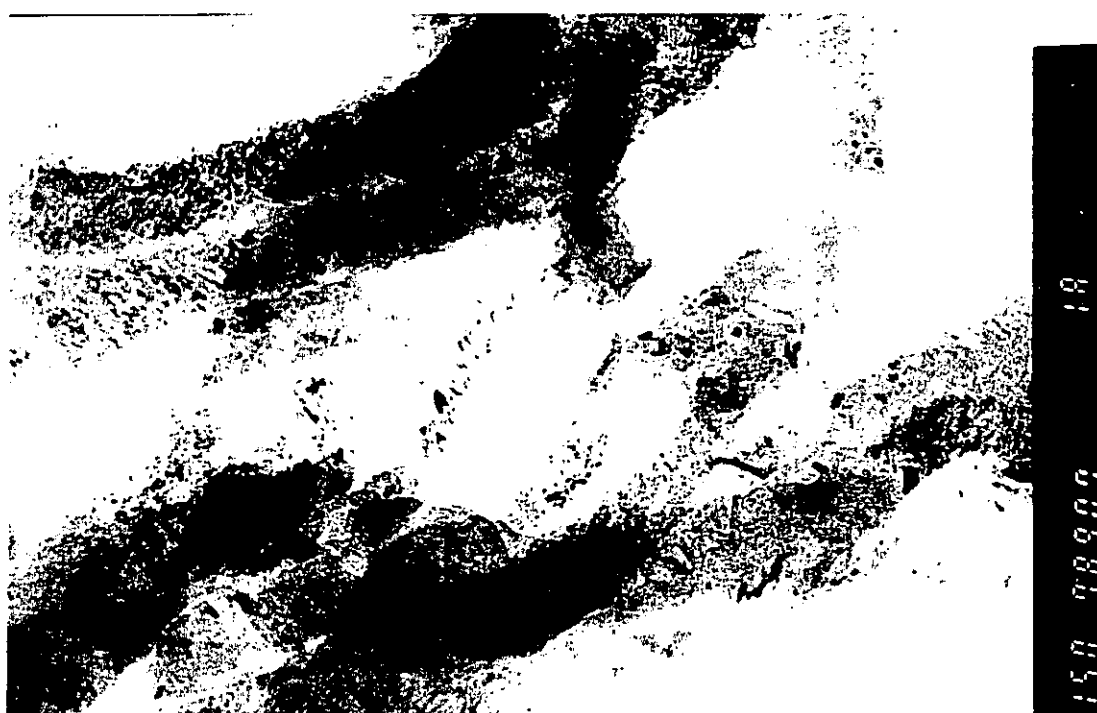


Figure 1 SEM (Hitachi-S4800) image (upper photo) and TEM image (lower photo) of the CNFs synthesized based the CVD reactions. TEM (Hitachi H-800) was operated at 200 kV was used.



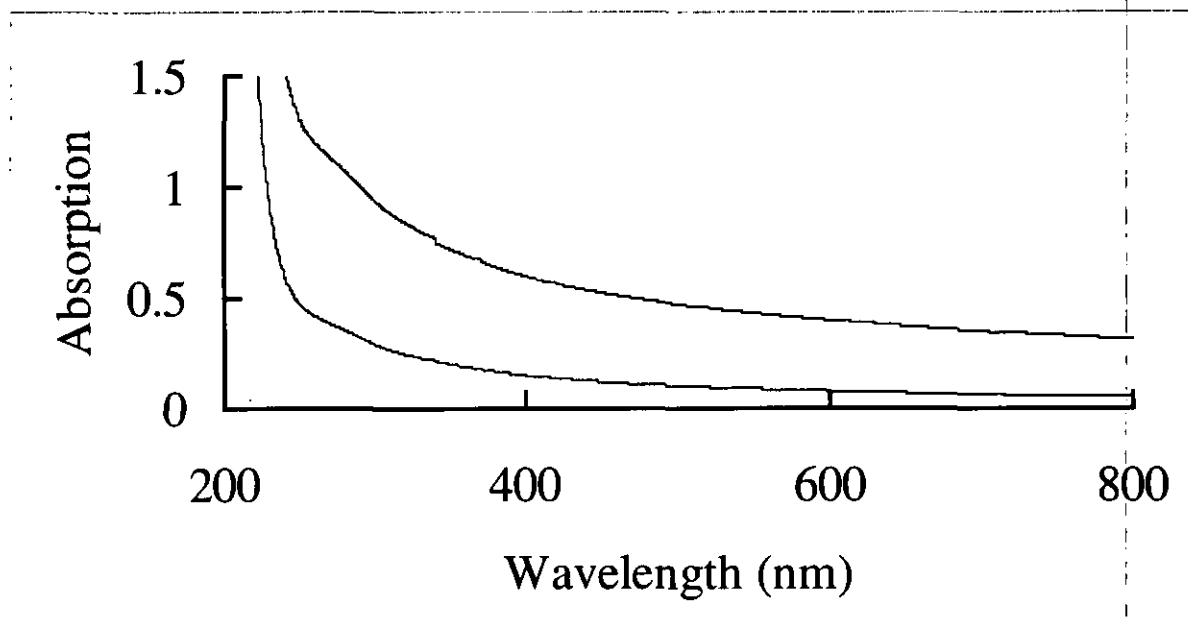


Figure 2 UV-vis absorption spectra of CNFs/Na-ALG colloids (upper trace) and the aqueous containing sodium alginate (Na-ALG) alone (lower trace).

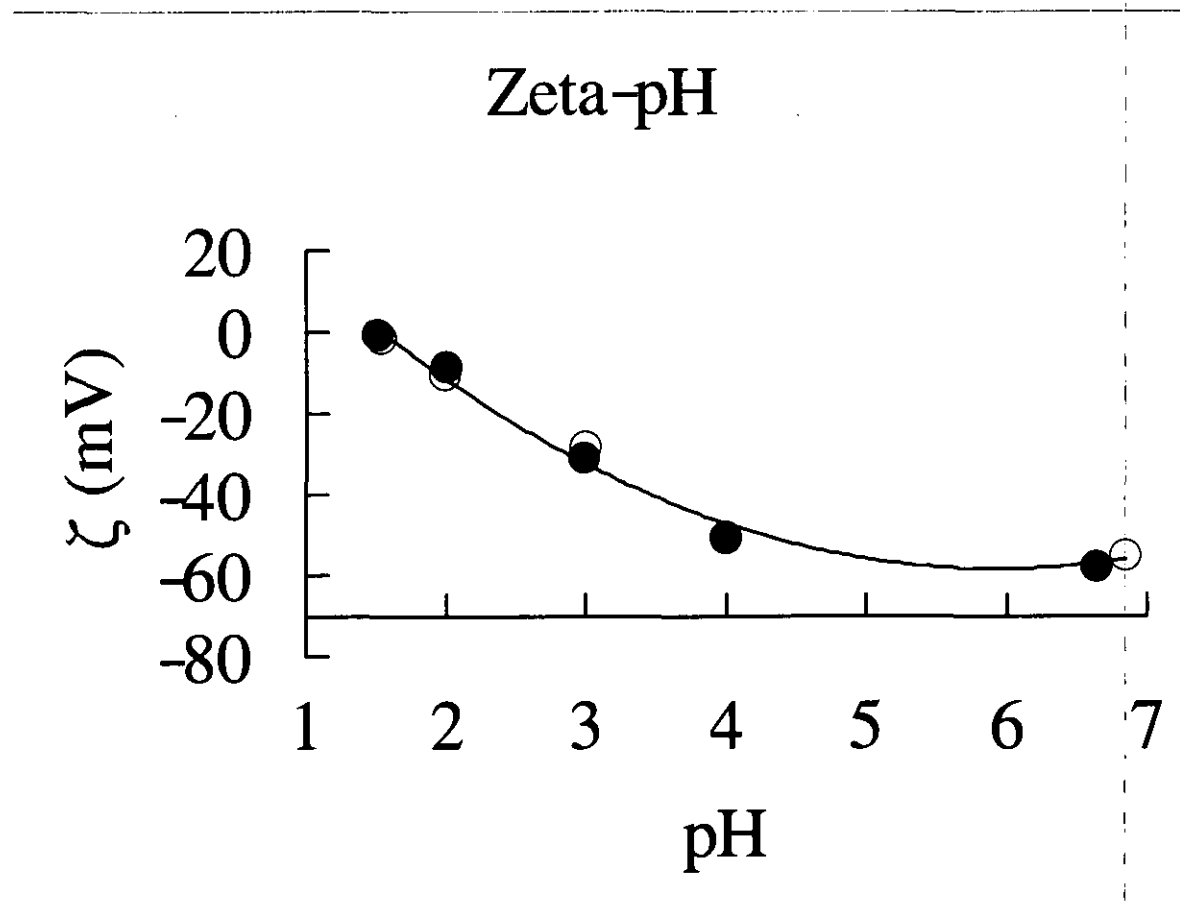


Figure 3 Zeta potential vs. pH plots. ●: CNFs/Na-ALG colloids; ○: aqueous solution containing Na-ALG alone.

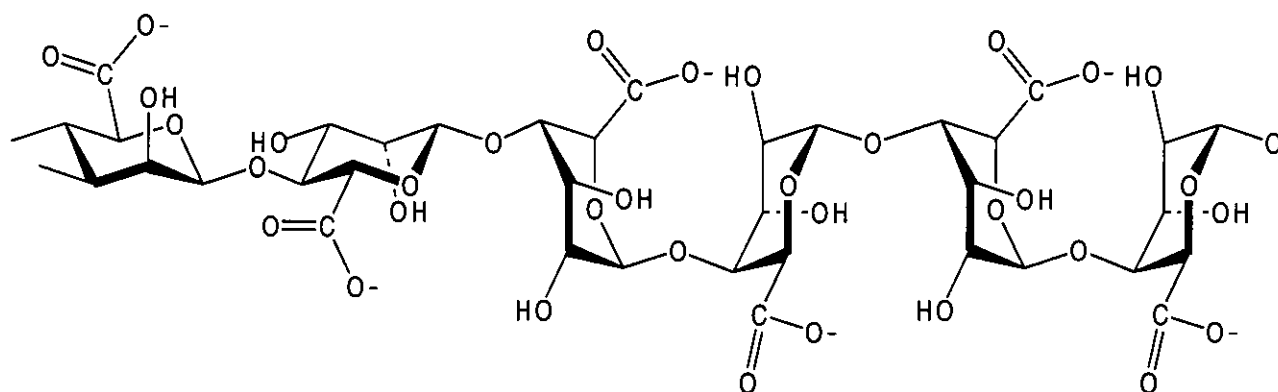


Figure 4 Sodium alginate with β -D-mannuronate and α -L-guluronate as the units.

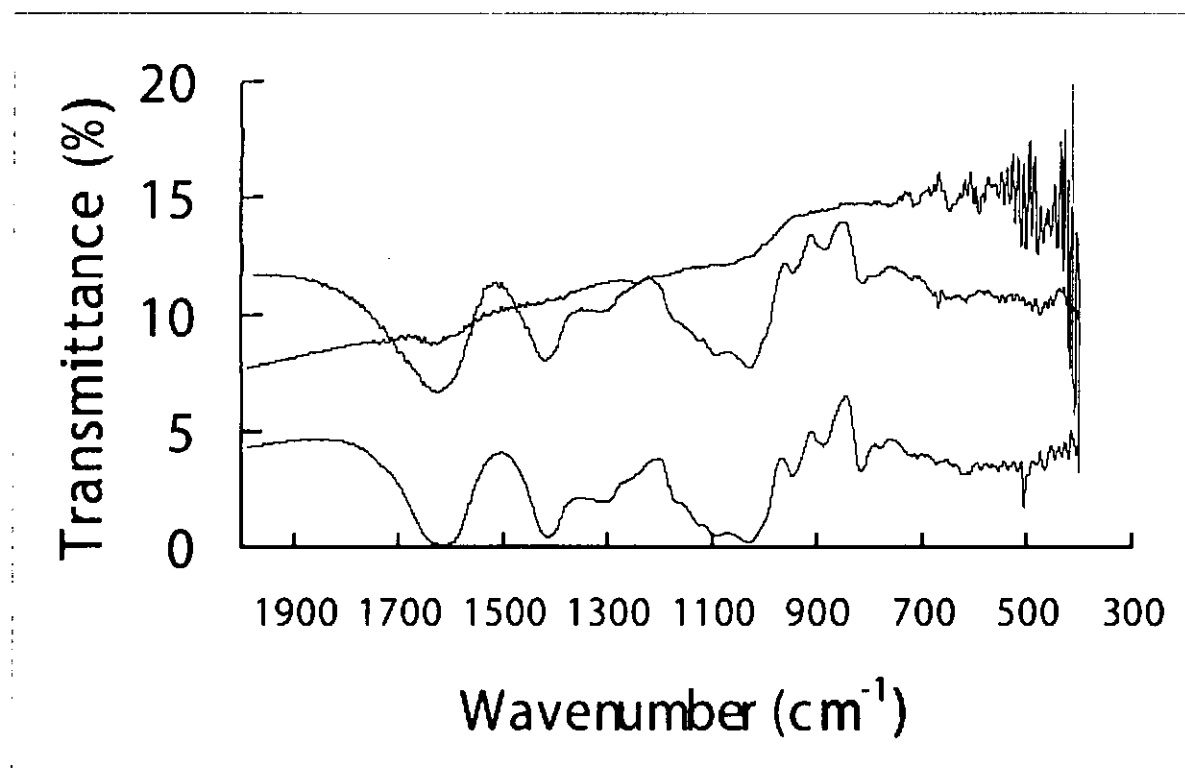


Figure 5 FT-IR spectra of CNFs (upper-trace), CNFs/Na-ALG complexes (medium trace) and the Na-ALG reference (lower trace).

Table 1 Experimental design of single dose study of CNT and CNF for rats.

Groups	Test compounds	Dose (mg/kg B.W.)	Observation period (week)			
			0 w	1 w	2 w	3 w
Non treatment ^a	-	0	1	-	-	-
Vehicle control	2% sodium alginate acid	0	-	1	-	-
CNF	CNF	1 mg/kg	-	1	1	1

a : Bled for pre-administration data.

Table 2 Hematology and biochemistry

		Non treatment	Vehicle control	CNF		
		0 w	1 w	1 w	2 w	3 w
WBC	/ μ L	5100	8100	3500	8400	7700
RBC	\times 10000/ μ L	654	721	643	728	752
Hb	g/dL	13.6	14.8	14.2	14.5	14.8
Ht	%	47.8	50.5	45.6	48.8	49.9
MCV	fL	73.1	70.0	70.9	67.0	66.4
MCH	pg	20.8	20.5	22.1	19.9	19.7
MCHC	%	28.5	29.3	31.1	29.7	29.7
Pla	\times 10000/ μ L	81.6	84.4	75.8	73.0	82.3
TP	g/dL	5.2	5.7	5.4	5.4	5.5
HDL-Chol	mg/dL	20	21	17	22	24
Glu	mg/dL	115	83	87	81	116
FC	mg/dL	12	13	13	13	14
Alb	%	47.4	46.2	45.5	48.4	50.2
α 1	%	21.6	19.4	19.3	22.0	18.5
α 2	%	10.0	7.0	9.4	7.5	6.5
β	%	16.2	21.7	21.5	18.6	18.4
γ	%	4.8	5.7	4.3	3.5	6.4
	g/dL	0.250	0.325	0.232	0.189	0.352

分担研究報告書

カーボンナノチューブの細胞に対する影響 —細胞増殖と抗酸化機能に関して—

柴 肇¹、古月文志²、進藤正信³、向後隆男³、亘理文夫³

¹富士レビオ(株)先端研究部、²北海道大学大学院地球環境科学研究科

³北海道大学大学院歯学研究科

研究要旨

カーボンナノチューブ(CNT)の細胞毒性や細胞増殖に対する影響は種々の方面から解析されつつあるが、現状では未知の部分が多い。また、生体内で何らかの生理機能を示すかどうかに関しても、未だに明確できていない。そこで我々は、ヒト由来の一般的な正常細胞として、真皮繊維芽細胞を用いて、その増殖に対してCNTが何らかの影響を示すかどうか確認した。材料としては、アルギン酸によって分散され可溶化されたCNT(可溶化CNT)を用いた。細胞の増殖をMTS法によりモニターしたところ、培養7日目までコントロールと同様の増殖及び生存を示し、CNTによる影響は全く観察されなかった。また、CNTの生理機能を見出すべく、その可能性の1つとしてCNTの抗酸化作用を計測してみた。その結果、可溶化CNT及び可溶化処理を施していない超音波分散CNTの両方において、抗酸化作用は検出されなかった。ただし、超音波によって分散化したCNTにおいては、抗酸化作用とは逆に活性酸素が生成する可能性も見出され、超音波処理したフラーレンで確認されている活性酸素の生成現象がCNTでも起こりうる可能性も否定できないと思われる。

1. MTS法を用いた細胞生存率測定によるカーボンナノチューブの細胞増殖促進物質としての機能評価

A. 研究目的

HF(human fibroblast)の生育に対してカーボンナノチューブが与える影響について評価した。

B. 研究方法

古月らの方法により可溶化した0.1 μ g/mlのカーボンナノチューブ(可溶化CNT)、およびそれを含まないコントロール溶液(可溶化溶媒)を、精製水によって5倍希釈しオートクレーブ滅菌した。これらを滅菌済み精製水によってさらに希釈し、4倍希釈系列(20、5、1.25、0.313、0.0781 ng/ml および5、20、80、320、1280倍希釈)をそれぞれ調製

した。調製した希釈系列と5%のFBSを含むDMEM培地を1対9の比で混合し、終濃度2、0.5、0.125、0.0313、0.00781 ng/mlの可溶化CNT、および50、200、800、3200、12800倍希釈のコントロール溶液を含む培地を調製した。

HF(p17)を、96穴プレート3枚(各60穴)に2000 cell/wellずつまき、10% FBSを含むDMEM培地200 μ lで37°Cにおいて3日間培養した。培養液を除去後、上記の可溶化CNTもしくはコントロールを含む培地200 μ lを5穴ずつ加え、37°Cにおいて培養を継続し、処理を開始した。

処理後1、2、7日目の細胞生存率をMTS法により確認した。MTS法はPromega社製CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kitを用い、そのプロトコールに従った。

C. 研究結果

HFを可溶化CNTおよびコントロール処理後、1、2、7日目の細胞生存率をMTS法により測定した結果をそれぞれ図1、2、3に示す。但し、生存率はMTS処理120分後のA₄₈₅の値から求め、次式より計算した。

生存率(%) = (各処理5穴の平均/5% FBSのみを含む培地で培養した際の5穴の平均) × 100

図1に示した処理後1日目の結果では、可溶化CNTで処理した細胞は、その濃度にかかわらず、可溶化CNT未処理の細胞と同程度の細胞生存率を示した。

図2、3に示した処理後2日目および7日目の結果も同様に、可溶化CNTで処理した細胞は、その濃度にかかわらず、可溶化CNT未処理の細胞と同程度の細胞生存率を示した。

D. 考察

本研究ではカーボンナノチューブがHFの生育に与える影響を解析した。実験には古月らの方法により可溶化したカーボンナノチューブを用い、濃度範囲は2~0.008 ng/mlとした。その結果、HFは可溶化CNTの濃度に関わらず1、3、7日目まで、未処理のものと同様の生存率を示した。このことから、可溶化CNTはHFに対し、細胞増殖の促進および阻害のどちらにも影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、可溶化CNTを含まない可溶化溶媒についても、HFの生存率が未処理のものと同程度であったことから、増殖の促進および阻害のどちらにも影響しないといえる。

E. 結論

MTS法を用いたHF生存率の測定結果より、可溶化CNTは細胞増殖促進能および細胞障害能のどちらも有していないことが明らかとなった。

2. ANTI OXIDANT TEST によるカー

ボンナノチューブの活性酸素除去能の測定

A. 研究目的

カーボンナノチューブと同様に炭素のみから構成されるフラーレンでは、その誘導体において高い活性酸素除去能が報告されている。本研究においては前述の可溶化したカーボンナノチューブ(可溶化CNT)および塩酸処理により精製されたカーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて、それぞれの活性酸素除去能を評価した。

B. 研究方法

25 μg/mlの可溶化CNTを精製水によって希釈し、1、0.1、0.01、μg/mlに調製した。同様にカーボンナノチューブを可溶化する際に用いた溶媒についても、精製水によって25、250、2500倍希釈し、CNT濃度0.01、0.1、1 μg/mlそれぞれのバックグラウンドとした。

MWCNTを10 mg秤量し、100 mlの精製水に加えた。これを15分間超音波処理し、カーボンナノチューブを精製水中に分散した。また同様に精製水を100 ml分注し、15分間超音波処理した。分散したMWCNTを超音波処理した精製水によって10、10³、10⁶、10⁹、10¹²倍に希釈した。

活性酸素除去能力はKnight Scientific Limited社製のAbel antioxidant Kitを用いて測定し、サンプルおよび各種溶液は添付プロトコルの5分の1容量で行った。コントロールとして、サンプルの代わりに精製水および超音波処理した精製水を用いた。

Solution B以外のすべての溶液を、ルミノメーター用チューブ内で混合し、それをルミノメーターにセットした。反応は、Solution Bを加えピペティングすることにより開始した。

発光度は2種類のルミノメーターを用いて測定した。LumitesterC -100(キッコーマン株式会社

製)を用いた際には、反応開始後0~10秒間の積算値を測定し、記録した。

LumitesterC-1000(キッコーマン株式会社製)を用いた際には、反応開始後0~25秒までの発光を1秒ごとに記録した。

C. 研究結果

Abel antioxidant Kit はコントロールの最大発光度に対する、サンプル添加時の最大発光度から、その発光減少率を求めることにより、サンプルの活性酸素除去能を算出する。発光減少率は次式より求める。

発光減少率(%) = $\{1 - (\text{サンプル添加時の最大発光度} / \text{コントロールの最大発光度})\} \times 100$

可溶化CNTの発光度の測定結果を図4に示す。但し、発光度は前述のLumitesterC-1000によって測定し0~10秒までの積算による測定値を示した。その結果、可溶化CNT 1 μ g/mlにおいて最大の発光減少率を示し、その割合は11%であったが、バックグラウンドである可溶化溶媒の25倍希釈では、14%の発光減少率であった。

超音波処理によって精製水中に分散させたMWCNTの発光度の測定結果を図5に示す。但し、発光度は前述のLumitesterC-1000によって測定した。また、コントロールおよびサンプルが測定開始1秒後に最も高い値を示したことから、このときの値を示した。精製水を15分間超音波処理したものをコントロールの値とすると、MWCNTの発光度は全てそれよりも高い値を示しており、発光の減少は見られなかった。最も高い発光を示したのは、 10^3 倍希釈したもので、コントロールの114%に値した。

D. 考察

古月らの方法により分散したカーボンナノチューブでは、活性酸素除去能を示す発光減少率が濃度依存的に増加した。しかしながら、バックグラ

ウンドとなるカーボンナノチューブ可溶化溶媒を、サンプルと同じ希釈倍率で希釈したものについても同様の傾向が見られた。これらのことより、可溶化CNTで見られた発光減少は、CNTの活性酸素除去能を示すものではないと考えられる。

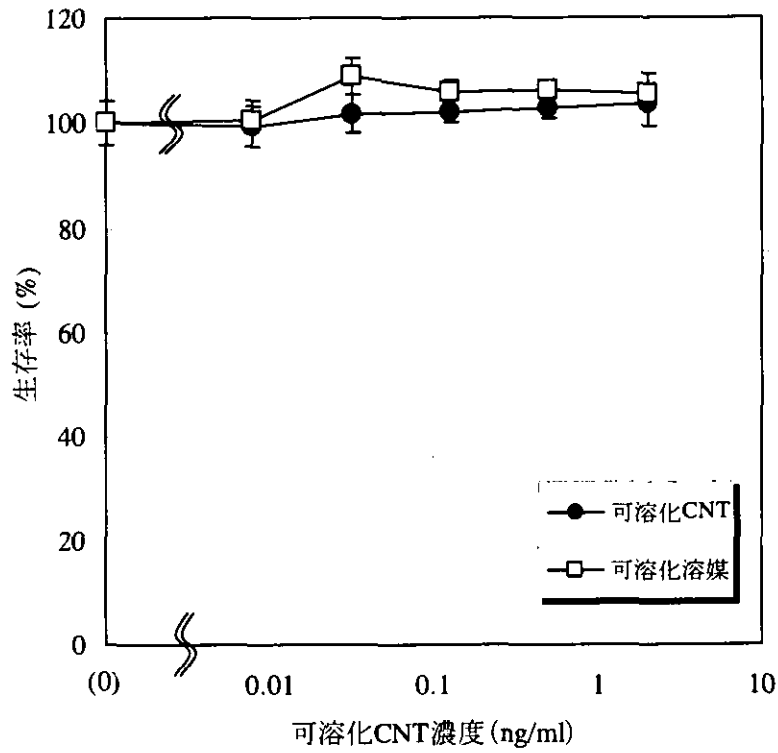
超音波処理により分散させたMWCNTでは、コントロールよりも高い発光度を示した。コントロールの発光度に対し、減少が見られない場合は活性酸素の除去能を有していないことを示す。

フラーレンでは、光の照射によりフラーレンに光エネルギーを吸収させ、吸収したエネルギーを近傍の酸素に与えて活性酸素を生成させることが可能である。この方法を応用し、超音波によって溶液中に生じる気泡が、破裂する際に発する微弱な光エネルギーで、フラーレンを励起できるという報告がある。同様なことが、カーボンナノチューブでも起こりうるとすれば、超音波処理によって分散したMWCNTには生成された活性酸素が含まれると考えられ、より高い発光度を示したことも説明できる。

E. 結論

可溶化したカーボンナノチューブおよび超音波処理によって精製水に分散させたカーボンナノチューブにおいて、活性酸素除去能は確認されなかった。また、フラーレンで見られる活性酸素生成能を考えると、分散化されたMWCNTも活性酸素生成能を持つ可能性は否定できない。今回の計測ではコントロールとの間に有意な違いは確認できないが、可能性としては否定できない。

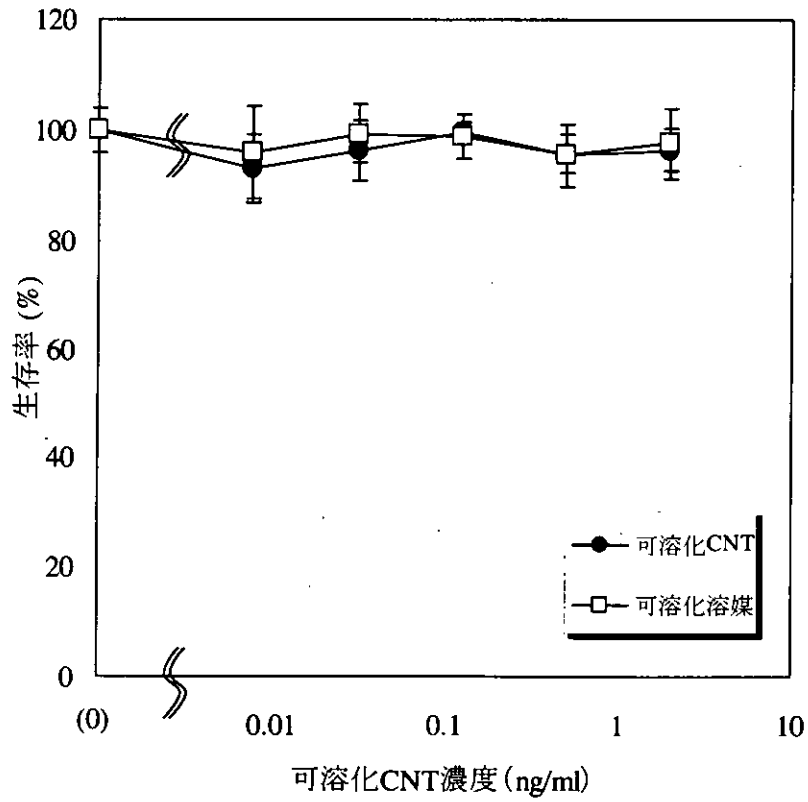
図1



注1) (0)には5%FBSのみを含む培地で培養した際の値を示した。

注2) 各プロットの上下には標準偏差を示した。

図 2



注1) (0)には5%FBSのみを含む培地で培養した際の値を示した。

注2) 各プロットの上下には標準偏差を示した。