

カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用

北海道大学大学院歯学研究科

○赤坂 司、横山敦郎、田村一央、宇尾基弘、亘理文夫

東北大学大学院工学研究科

佐藤義倫、田路和幸

緒言

近年、最も注目されている材料の1つにカーボンナノチューブ（CNT）が挙げられ、エレクトロニクス分野やエネルギー分野を中心に集中的な研究が進行中である。報告例は多いとはいえないが、CNTのバイオ分野への応用研究も開始されており、AFMの探針、タンパク質の結晶化、バイオセンサーへの応用が注目を集めている。本研究ではバイオ分野におけるCNTのさらなる応用を目的として、CNTの機能化法やバイオ応用を検討することとした。

当面の検討項目を大きく分け、(1) 表面処理（化学的、物理的）(2) 固定化法（化学的、物理的）分散法、(3) 使用用途 とし、現段階ではCNTについて不明の点が多いため、広範囲に検討を行うこととした。現在の進行状況をについて以下の題目に分け報告する。

(1-1) 表面処理（化学的）

題目1：「酸化型多層カーボンナノチューブとBiotin-amineとの縮合剤による結合」

(1-2) 表面処理（物理的）

題目2：「糖鎖によるカーボンナノチューブの表面修飾」

題目3：「再結晶化を利用したアパタイトによる多層カーボンナノチューブの表面修飾」

(2) 固定化法（物理的）

題目4：「濾過膜上への多層カーボンナノチューブの固定化」

題目5：「歯質スライスへの多層カーボンナノチューブの吸着」

1. 題目：「酸化型多層カーボンナノチューブとBiotin-amineとの縮合剤による結合」

1-1. 研究目的

生物学的分野においてラベルとして多用されるビオチン（アビジンとの特異的な結合を示す）分子を酸化型MWCNTへ共有結合にて導入するため、縮合剤（EDC等）を用いた導入を検討した。

1-2. 研究方法

材料

MWCNT (NanoLab社、純度80%、番号A1、塩酸処理済)

Biotin-amine : (+)-Biotin-(PEO)3-amine (MolecularBioSciences社、)

EDC : 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride

実験操作

代表的な実験例を示す。MWCNT (NanoLab) を30%過酸化水素水にて酸化(12h, reflux)し、脱イオン水にて十分洗浄した。MWCNT(2mg), EDC(5mg) を脱イオン水10mLに加え超音波処理を行い、活性化のため30-60分静置した。Biotin-amine(10mg) を加え時々超音波処理をしながら12時間反応を行った。反応終了後、数分間の超音波処理を行い、すみやかに限外濾過(孔径0.2 μ m、ろ過膜)にて完全に濃縮した。膜上のMWCNTは、そのまま200mLの脱イオン水にて洗浄した。さらなる洗浄として、①H₂Oに分散→超音波処理→限外濾過→200mL H₂O洗浄、②0.1NHClに分散→超音波処理→限外濾過→200mL 0.1NHCl洗浄のサイクルを、①×3回、②×2回、①×1回の順にて行った。分析はFT-IRおよび600MHz ¹H-NMRを用いて行った。コントロール実験(MWCNT vs Biotin-amine、縮合剤なし)も合わせて実施した。

1-3. 研究結果と考察

この実験の結果で最も知りたいことは、Biotinが物理的でなく化学的な共有結合(アミド結合)として結合していることである。コントロール実験にてBiotin分子自身の物理吸着が起こっているのは明らかだったので、洗浄工程の途中でのBiotin分子の結合をFT-IRにて追跡した。その結果、①×3、②×1の洗浄工程にて完全にBiotin分子のピークは消失した。また一方で、反応を行ったMWCNTに関しても同様な洗浄工程を行いFT-IRによって分析したところ、Biotin分子の確認はできなかった。このことは同時にFT-IRでの分析では感度が低く、化学的な結合の確認は困難であることを示唆していると考えられた。

よって、さらに分析感度を高くする必要があったため、600MHz ¹H-NMRを用いての検討を行った。十分洗浄したMWCNTのNMR観察を行った結果、コントロールおよび反応後MWCNTにおいて物理吸着に由来するBiotin-amineのピークが明らかに観察された(データは示さず)。一方で、化学的な結合に由来するピーク(新たに生成するアミド結合)は観察されなかった。このことは、上記洗浄工程では完全にBiotin-amineを洗浄することができないことを示しており、MWCNTに対するBiotin-amineの物理吸着力は予想以上に強いことが推測された。さらに、化学的結合が観察されなかったのは、(a) MWCNTの反応箇所が極端に少ないため、(b) 反応が進行していないためのどちらかが考えられるが、過去の文献における縮合反応の容易さから考えて(a)の可能性が高いと推測した。

1-4. 結論

これらのことより明らかになった事項をまとめると以下のようなになる。

- ・ FT-IRは感度が悪く化学結合の観察は困難
- ・ ¹H-NMRは感度がよいので化学結合の観察が可能である確立が高い
- ・ MWCNTとの反応剤Biotin-amineとの物理吸着は強く、水系での洗浄は困難
- ・ MWCNTは反応箇所が極端に少ないため、化学結合の観察が困難

今後は、反応箇所が多いMWCNT（短い）またはカーボンナノファイバー（旧ナノロッド）を原料として反応を行い、洗浄条件の最適化（アルコール溶媒、超音波処理等）を検討し、¹H-NMRにより確認を行うのがよいと考えられる (Fig. 1-1)。

2. 題目：「糖鎖によるカーボンナノチューブの表面修飾」

2-1. 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ビオチン、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。ここでは、人工複合糖質高分子を用いてMWCNTの表面修飾を検討した。

2-2. 研究方法

材料

MWCNT (NanoLab社、純度80%、番号A1、塩酸処理済)

MWCNT (MTR社、純度75-85%、番号M1) を塩酸処理

PVLA : Poly-(N-p-vinyl benzyl-0-b-D-galactosyl-D-gluconamide) (MW : 5×10^4 、生化学工業)

FITC-PVLA : FITC-labeled PVLA (生化学工業)

Rhod-RCA₁₂₀ : rhodamine-labeled *Ricinus communis* agglutinin (β -galactose specific lectin)

Rhod-ConA : rhodamine-labeled concanavalin A (α -glucose- or α -mannose- specific lectin)

実験方法

MWCNTとPVLAの相互作用

MWCNT (NanoLab or 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10 μ g PVLAを加え、さらに15分間超音波処理を行い1時間インキュベートした。その後、遠心分離 (14000rpm, 10min) によりMWCNTを集め、PBS \times 3回、H₂O \times 2回による洗浄を行った。乾燥

物としたものは、FT-IRにより分析した。FITC-PVLAを用いて調製し、溶液としたものは共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により観察した。

- * MWCNT/PVLA : MWCNTにPVLAに相互作用させた化合物を示す。
- * MWCNT/FITC-PVLA : MWCNTにFITC-PVLAを作用させた化合物を示す。

MWCNT/PVLAとレクチンの相互作用

少量のMWCNT (NanoLab or MTR) /FITC-PVLAをPBS (+)に加え、Rhod-RCA₁₂₀またはRhod-ConA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、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。

MWCNTとレクチンの相互作用

MWCNT (MTR) をPBS (+) に加え濃度25μg/500μL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。

2-3. 研究結果と考察

FT-IRを用いてMWCNT (NanoLab) /PVLAを分析した結果 (Fig. 2-2)、MWCNTとPVLAの両方に由来するピークが観察された。このことより、洗浄してもPVLAがMWCNTに結合していることが分かった。特に、結合によるピークシフトは観察されなかった。

続いて、PVLAの結合をより明らかに観察するため、FITCラベルされた糖質高分子である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Fig. 2-3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。このことはMWCNTの表面に密にPVLAが結合していることを示している。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結合が観察され、ナノチューブの長さに沿って密に蛍光が観察された。これらのことより、PVLAはMWCNTの表面に結合す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。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が、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示された。

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。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

Fig. 2-4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 (Fig. 2-5)。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。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 (Fig. 2-6)、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Fig. 2-4と2-5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。

2-4. 結論

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を示した。その結合は、PBSやH₂Oでの洗浄でははがれない程度に強い。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 (Fig. 2-1)、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。それらに加えて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。

今後は、PVLA以外の糖質高分子、糖タンパク質、糖脂質などを用いてMWCNT (またはその他のカーボン材料) への結合実験を行うとともに、糖鎖の機能を利用して①細胞への様々な応用、②微生物・ウイルスの感染阻害、③糖鎖抗体の産生増進、④ナノ構造構築の材料、⑤分析機器への応用が期待される。

3. 題目：「再結晶化を利用したアパタイトによる多層カーボンナノチューブの表面修飾」

3-1. 研究目的

DNAやタンパク質の物理吸着によるMWCNTの表面修飾が過去に報告されている。また、上記では糖質高分子の物理吸着を報告した。ここでは、MWCNT表面へのイオンの吸着により、表面修飾が可能であるか予備実験的な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た。

3-2. 研究方法

材料

MWCNT (NanoLab社、純度80%、番号A1、塩酸処理済)

MWCNT (MTR社、純度75-85%、番号M1) を塩酸処理したもの

実験操作

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MWCNT (MTR) を1 mg加えた。15分間超音波処理を行い、37℃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。

3-3. 研究結果と考察

再結晶化後のMWCNT (MTR) のSEM像 (Fig. 3-1) では、主に3種類の構造物が観察された。観察場所A (Fig. 3-2) では、明らかな結晶 (平均: 長さ1μm、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 (Fig. 3-3) 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ューブで観察された。観察C (Fig. 3-4) では、チューブを含んだ板状の物質が観察された (SEM像では分かりにくい)。チューブの太さより推定すると厚さは200nm前後 (SEM観察より判断) と考えられる。この板状物質の光学顕微鏡 (金属顕微鏡、反射測定) においては、比較的厚さが均一な物質であることが分かった (データ示さず)。

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Fig. 3-5およびFig. 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 (Fig. 3-7) 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 (Fig. 3-8、Fig. 3-9)。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。Ramanスペクトルにより放射状結晶の分析を行ったところ (Fig. 3-10)、リ

ン酸に由来するピーク (412, 566, 938, 943 cm^{-1}) が観察された。特に、MWCNT (MTR) 上の結晶では 938 cm^{-1} のピークが鋭いことより、比較的結晶度が高いアパタイトの可能性が示された。

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ことが示唆された。

3. 4. 結論

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。

4. 題目：「濾過膜上への多層カーボンナノチューブの固定化」

4-1. 研究目的

MWCNTは、直径がナノメートルで長さがマイクロメートルオーダーのチューブ状のナノ材料である。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が考えられる。ここでは細胞培養担体としての利用を考え、MWCNT分散液を濾過することによる濾過膜上への固定化を試みた。

4-2. 研究方法

材料

MWCNT (NanoLab社、純度80%、番号A1、塩酸処理済)

PTFE : Polytetrafluoroethylene (孔径1.0 μm 、直径47mm、アドバンテック)

PC : Polycarbonate (孔径0.8 μm 、直径47mm、アドバンテック)

実験操作

200 μg のMWCNT (NanoLab) を100mLの脱イオン水へ加え、超音波処理を15分間行った。超音波処理後のMWCNT分散液は、すぐに吸引濾過を行った。吸引濾過には、PTFE膜またはPC膜を使用し、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、収縮を防ぎながら乾燥させるため、吸引濾過機に挟んだまま60 $^{\circ}\text{C}$ にて乾燥させた。MWCNTペーパー作製のためには100mgのMWCNTを用いた。

4-3. 研究結果と考察

MWCNT (NanoLab) 分散液を吸引濾過により濾過膜上へ固定化した。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 (Fig. 5-1 左図)。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。Fig. 5-1 真図は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、Fig. 5-1 右図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 (Fig. 5-2とFig. 5-3)。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)。

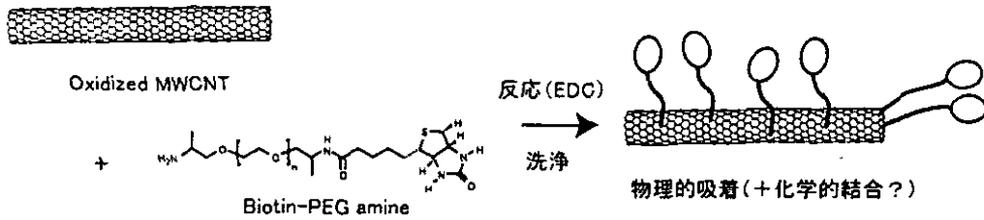
以上の結果より、吸引濾過という非常に簡単な方法によりMWCNTの濾紙上への固定化を達成することができた。

4-4. 結論

細胞培養担体として使用することを目的として、吸引濾過を用いてMWCNTを濾過膜上にコートした。吸引濾過を用いる固定化法は非常に簡単かつ迅速であり、有用な方法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 (旧カーボンナノロッド)) 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。

題目：「酸化型MWCNTとBiotin-amineとの縮合剤による結合」



現在の状況： 反応試薬自体が物理吸着し、洗浄しても取れない
 1H-NMRでの分析は感度がよいが、化学結合は未検出
 長いMWCNTだと、反応箇所が少なすぎるのでは？

今後は： 洗浄の条件の決定(有機系の洗浄、超音波など)
 短いMWCNTやCNF(旧ナノロッド)の使用、分析は1H-NMR

Fig. 1-1 Biotin化の現状と今後の予定

題目：「糖鎖によるカーボンナノチューブの表面修飾」

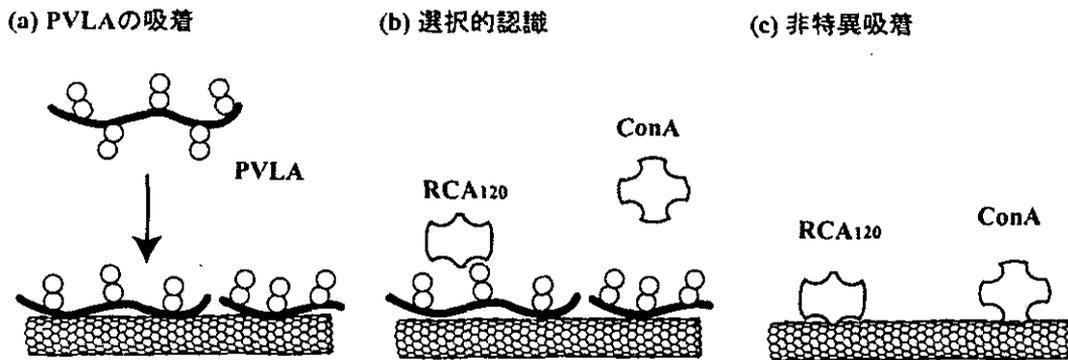


Fig. 2-1 実験結果の模式図 (a) 糖質高分子PVLAがMWCNT表面に吸着する、(b) MWCNT表面の糖鎖はレクチンにより選択的に認識される、(c) 糖鎖で覆わないとレクチンは非特異吸着する。

Fig. 2-2 MWCNT/PVLAのFT-IRスペクトル

(KBr法、ベースライン補正済)

- (a) MWCNT (NanoLab) のみ
- (b) MWCNT/PVLA
- (c) PVLAのみ

MWCNT (NanoLab) とPVLAを混ぜて、精製したMWCNT/PVLAのスペクトルは、両方に由来するピークが観察された。

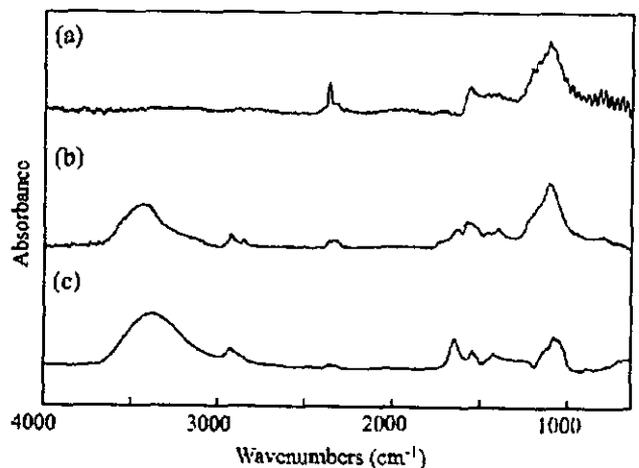


Fig. 2-3 MWCNT/FITC-PVLAの蛍光CLSMイメージ
 (上段: NanoLab、下段: MTR) ScareBar = 10 μ m

上段のMWCNT (NanoLab) の場合、チューブ直径が細いため顕微鏡ではチューブの形は観察されないが、その凝集体の輪郭にそって蛍光が観察された。下段のMWCNT (MTR) の場合、チューブの長さ方向に沿って密に蛍光が観察された。

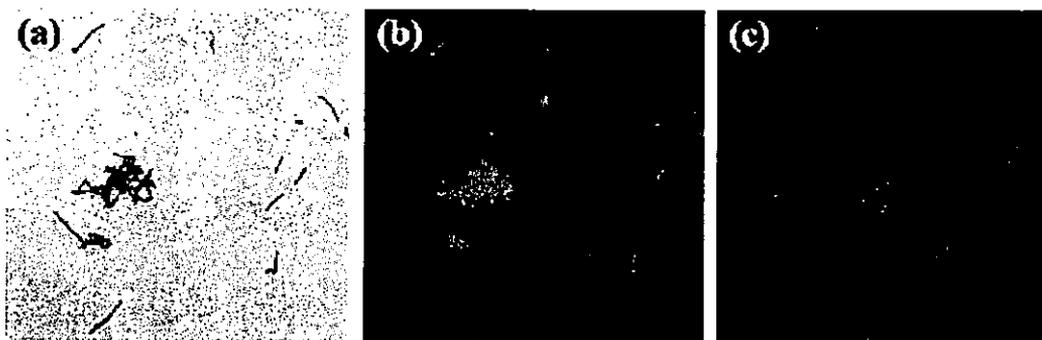
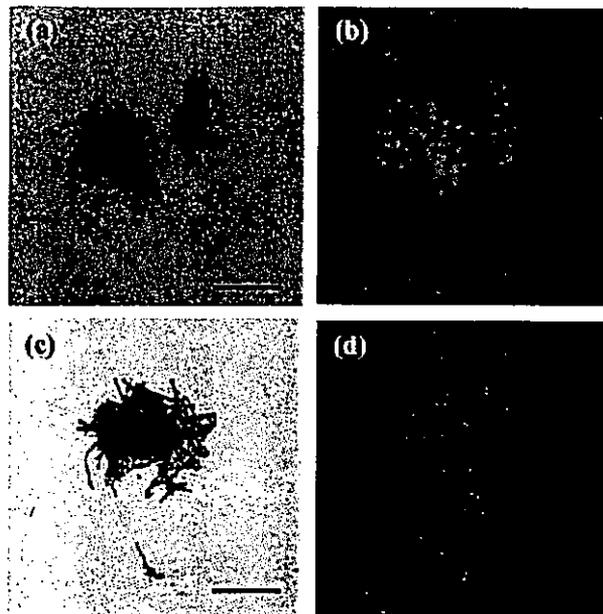


Fig. 2-4 Rhod-RCA120とMWCNT/FITC-PVLAの相互作用後の蛍光CLSMイメージ

(a) 透過像、(b) FITC Channel、(c) rodamine Channel ScareBar=10 μ m

MWCNTの表面に結合している糖鎖 (β -ガラクトース) は、相当するRCA120レクチン (β -ガラクトース特異的) と結合する。

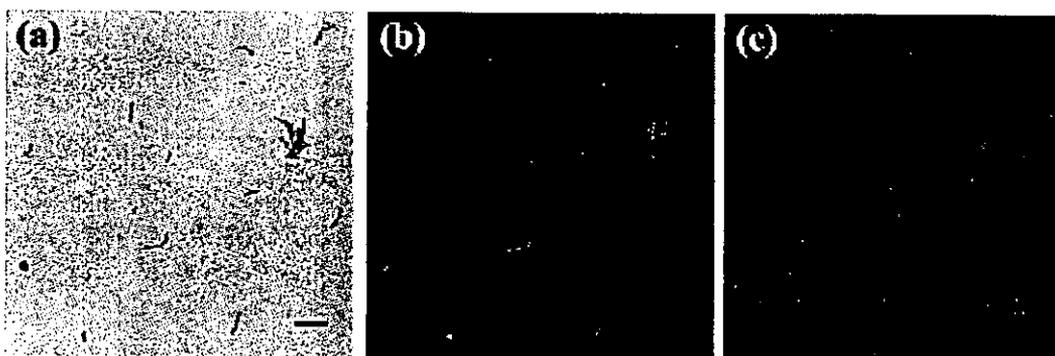


Fig. 2-5 Rhod-ConAとMWCNT/FITC-PVLAの相互作用後の蛍光CLSMイメージ

(a) 透過像、(b) FITC Channel、(c) rodamine Channel ScareBar=10 μ m

一方で、特異性が異なるConAレクチン (α -マンノースまたは α -グルコース特異的) とは結合しない。

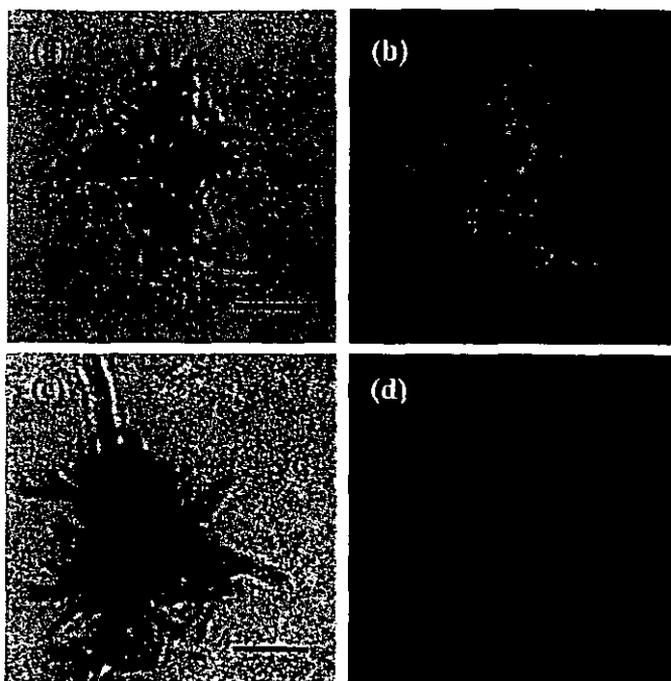
Fig. 2-6 はだかのMWCNT (MTR) とレクチンの相互作用後の蛍光CLSMイメージ

(左側：透過光、右側：蛍光)

上段は、MWCNT vs FITC-RCA120

下段は、MWCNT vs Rhod-ConA

ScaleBar = 10 μ m



MWCNTへの両方のレクチンの非特異吸着が観察された。

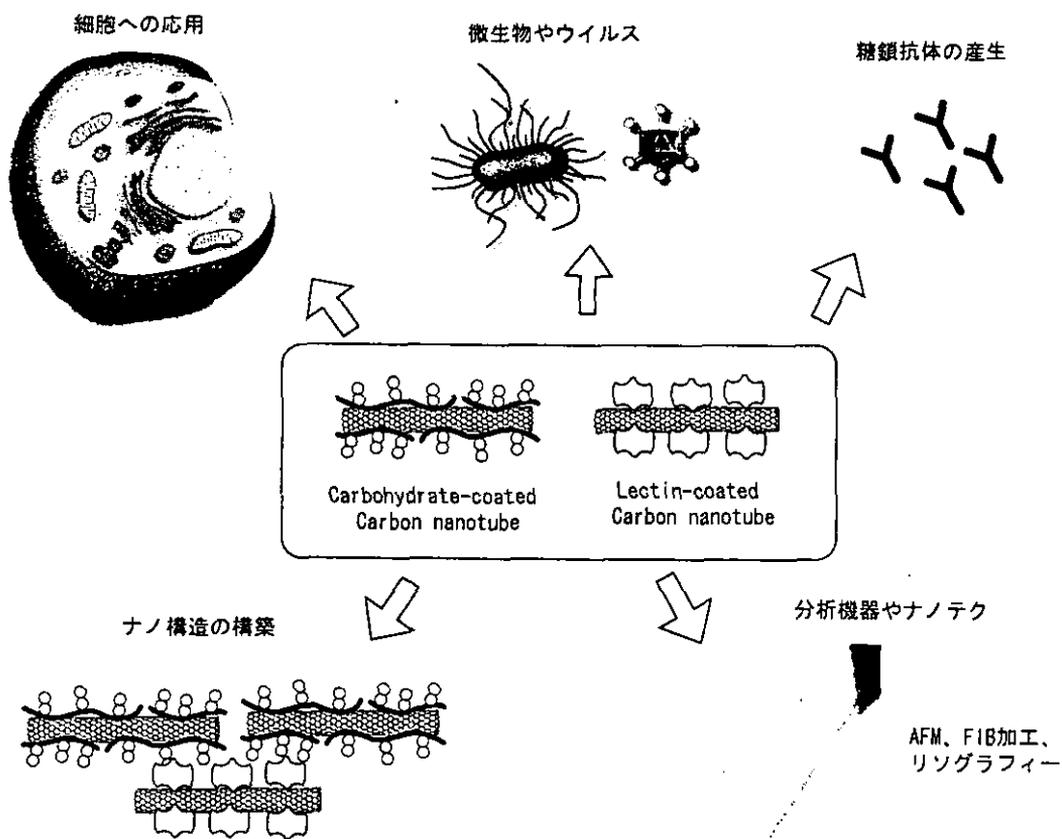


Fig. 2-7 糖鎖orレクチンMWCNTの応用例

題目：「再結晶化を利用したアパタイトによるMWCNTの表面修飾」

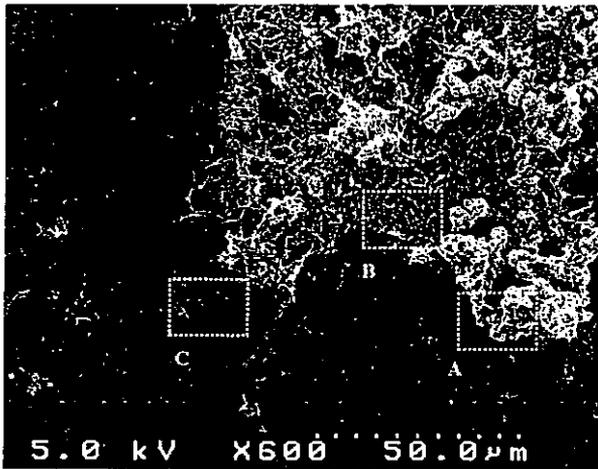


Fig. 3-1 再結晶化後のMWCNT (MTR) のSEM像

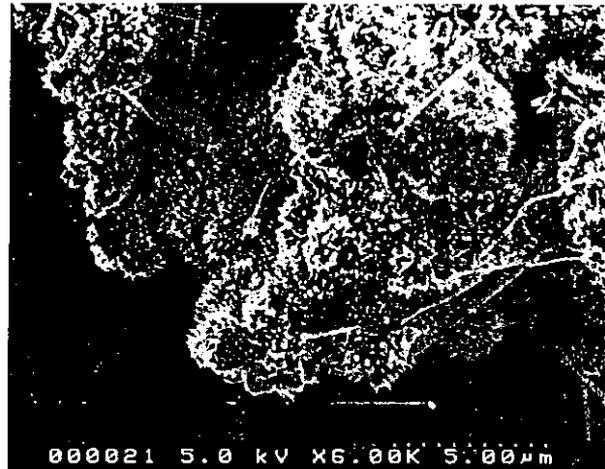


Fig. 3-2 観察地点AのSEM像

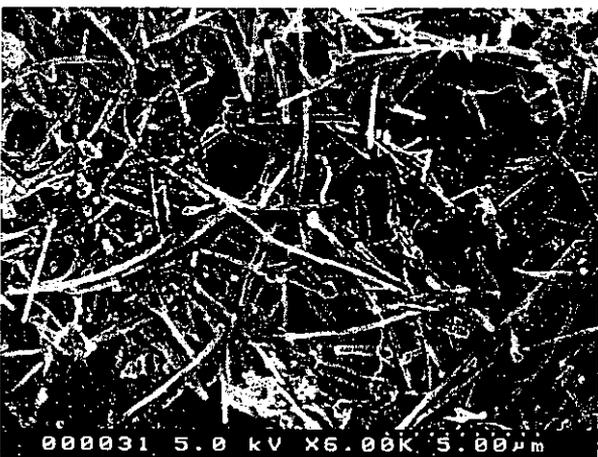


Fig. 3-3 観察地点BのSEM像

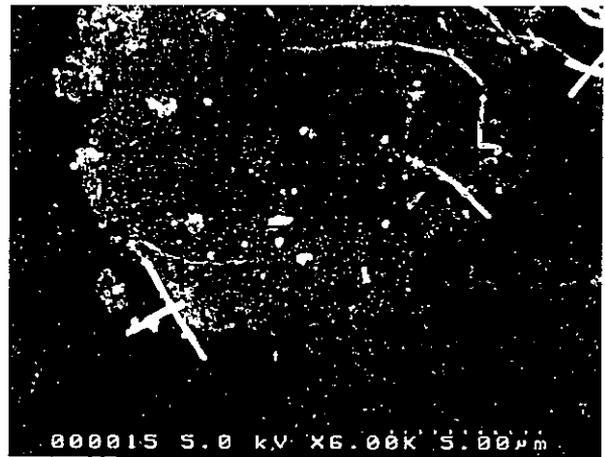


Fig. 3-4 観察地点CのSEM像



Fig. 3-5 MWCNTコア結晶成長のSEM像 (1)



Fig. 3-6 MWCNTコア結晶成長のSEM像 (2)

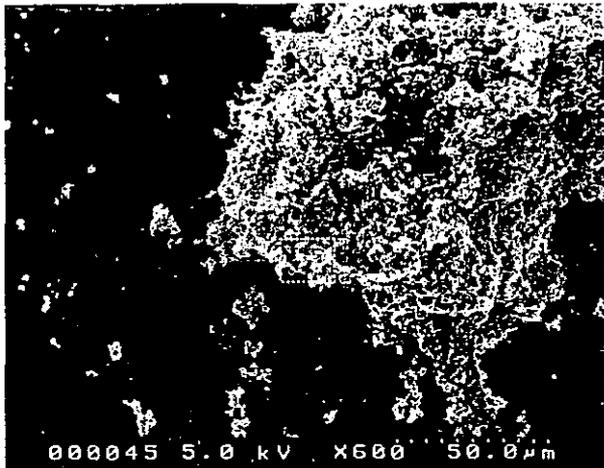


Fig. 3-7 再結晶化後のMWCNT (NanoLab) のSEM像

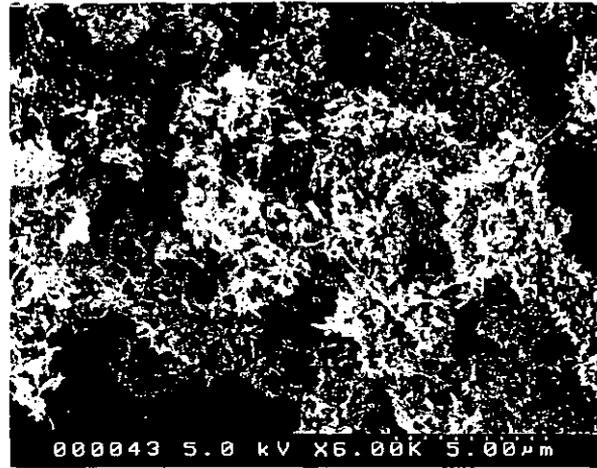


Fig. 3-8 強拡大 (Fig4-7の枠) のSEM像

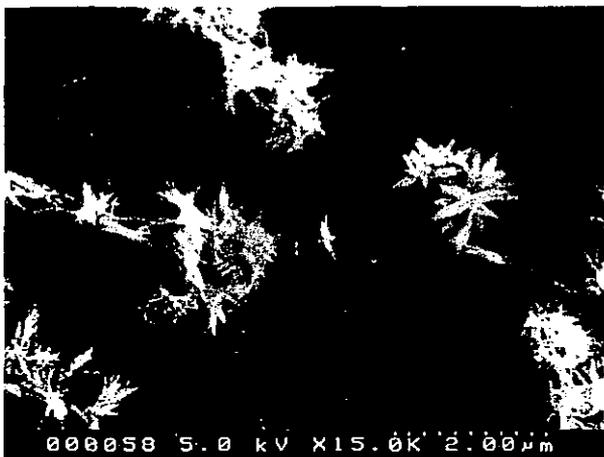


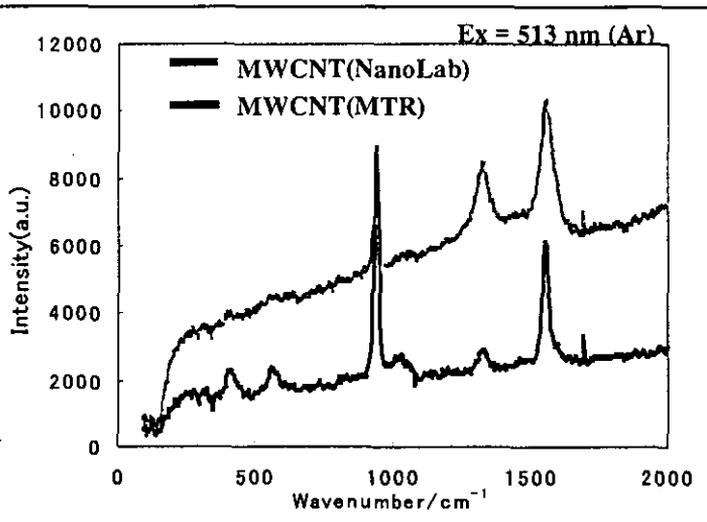
Fig. 3-9 MWCNTコア結晶成長のSEM像 (1)



Fig. 3-10 結晶成長のSEM像 (2)

Fig. 3-11 MWCNTコア成長した結晶の Ramanスペクトル

リン酸に由来するいくつかのピーク (鋭いものもある) が観察されるので アパタイトである可能性が高い。



題目「カーボンナノチューブの濾過膜上への固定化」

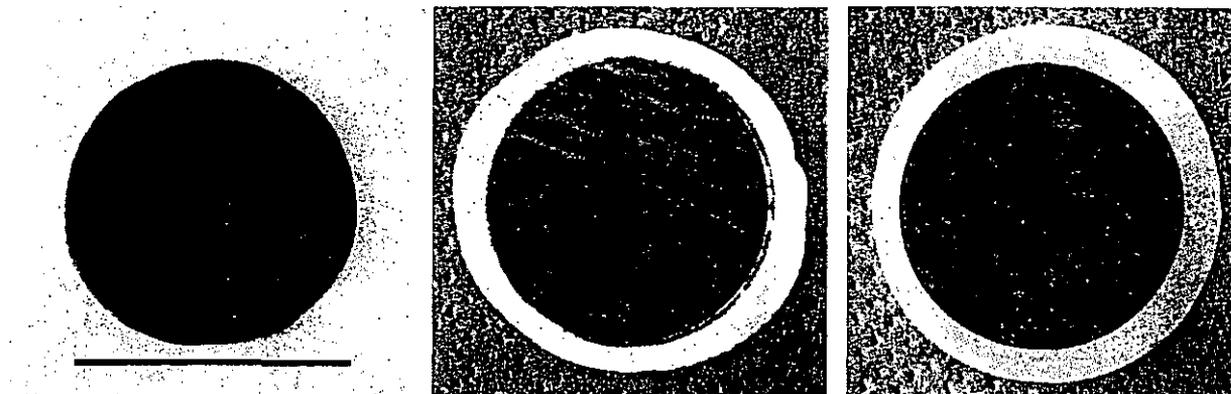


Fig. 4-1 固定化したMWCNT (NanoLab) の写真。(左図) MWCNTのみで固定化したペーパー状MWCNT、(真中) PTFE膜上に固定したMWCNT、(右図) PC膜上に固定化したMWCNT。ScareBar=3.5cm

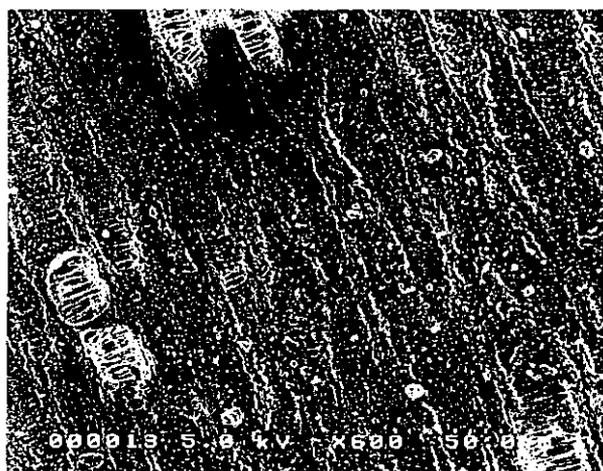


Fig. 4-2 MWCNT固定化PTFEのSEM像

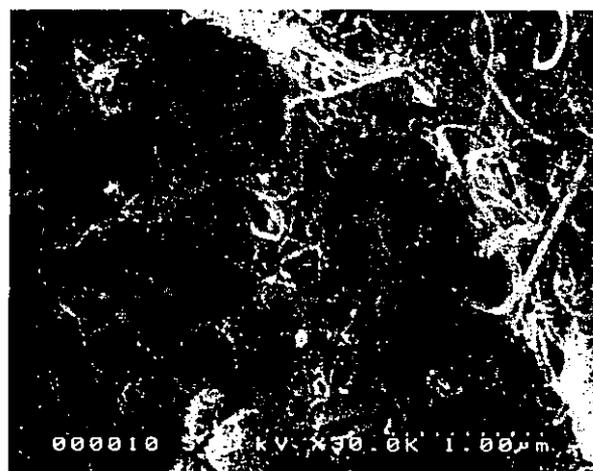


Fig. 4-3 MWCNT固定化PTFEの強拡大SEM像

カーボンナノチューブの長さ制御 (2)

東北大学大学院環境科学研究科

○秋本結輝、佐藤義倫、田路和幸

1. はじめに

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ナノサイズの空間を持ったチューブ状の物質である。近年、このナノチューブの空洞を利用した生体内へのバイオ応用が試みられている。しかし、CNTsは化学的性質がグラファイトに酷似しており、数10 μm の長さがあるため、水への分散化・水溶化が困難であること、またCNTsを分散化・水溶化させる界面活性剤は生体内の反応に影響を与え、起こっている反応事象を複雑にするために使用できないことなどが、生体分野へのCNTsの応用を妨げている。したがって、界面活性剤を使わずにCNTsを水に分散化・水溶化させる技術の開発が要求されている。そこで、我々は糸まり状のCNTsを短く切断し、オゾン照射によりCNTs酸化物を形成させ、アルカリ水溶液処理によって水溶化CNTsの合成法を試みている。本研究では、水溶化CNTsを合成する前段階の「CNTs精製技術」と「強酸下での超音波CNTs切断法」について報告する。

2. 実験方法

CNTs 精製 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。MWCNTs 100 mgを大気中、273 Kで90分間燃焼する。その後、燃焼物を6M-HCL 100 mLに入れ、333 Kで12時間静置させ金属微粒子を除去する。この溶液を0.1 μm のメンブランフィルターでろ過し、大気中、333Kで乾燥させる。

CNTs 切断 上記で精製されたMWCNTs 100 mgを濃硫酸:濃硝酸=3:1 (v/v%)の混合液 100mLに入れ、超音波を5時間照射する。照射後、100 mLの蒸留水を加え、0.1 μm のメンブランフィルターでろ過する。ろ過物の洗浄はろ液が中性になるまで行い、洗浄後のろ物は大気中、333Kで乾燥させる。

3. 結果と考察

図1、2はMWCNTsの精製前後のSEM写真である。精製前はアモルファスカーボン、金属微粒子が目立つが、精製後ではそれらは取り除かれ、MWCNTsの純度が向上されていることがわかる。MWCNTsの形状は糸まり状であり、精製後のMWCNTsは蒸留水やエタノールの極性溶媒には分散しなかった。

図3、4はMWCNTsの切断処理後の低倍と高倍のSEM写真である。切断されたMWCNTsの長さは1 μm 以下のサイズであり、凝集している様子は観察されなかった。切断したMWCNTsは、水、エタノールなどの極性溶媒によく分散した。TEM観察から、MWCNTsの表面（多層ナノチューブの最外層）はダメージがあり、その部分にカルボキシル基、水酸基、アルデヒド基が導入されていると考えられる。多層ナノチューブの内側の層はダメージが観察されず、002面の格子像が鮮明に観察されたことから、内側の層は結晶性が良いと考えられる。

4. 結論

カーボンナノチューブはその合成方法により、カーボンネットワークの結晶性、不純物の状態が異なり、精製法や切断法もそれぞれのチューブに適した方法を施さなければならない。今回のナノラボ社のMWCNTsは「燃焼酸化精製法」と「強酸下における超音波照射切断法」によって大量に精製・切断することができた。これによって、水溶化ナノチューブの合成を行うためのサンプルを大量に調製することが可能になった。

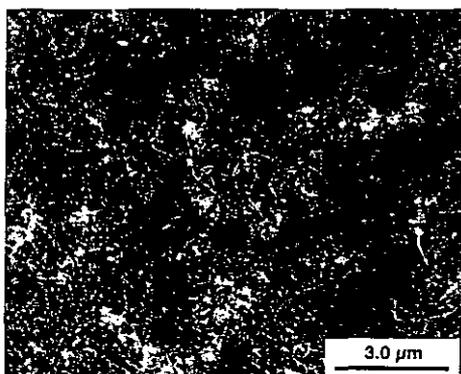


図1 精製前のMWCNTsのSEM写真.

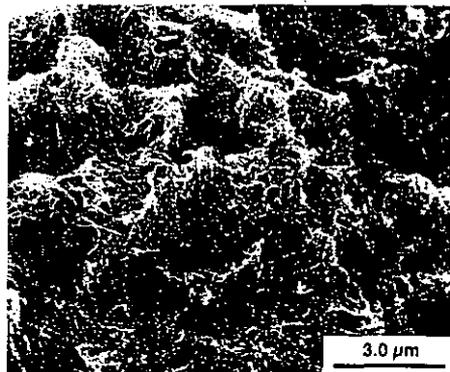


図2 精製後のMWCNTsのSEM写真.

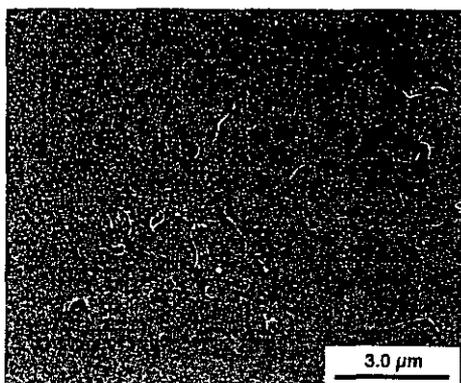


図3 MWCNTs切断後のSEM写真.
(10000 倍)

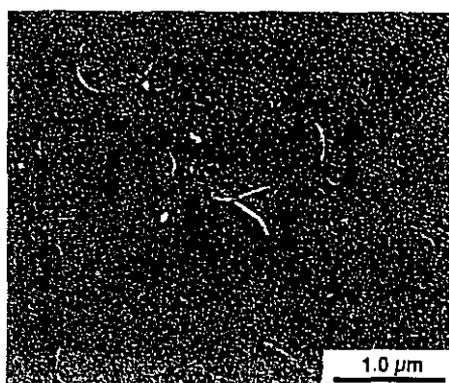


図4 MWCNTs切断後のSEM写真.
(30000 倍)

マイクロ・ナノ粒子に対する細胞の反応

田村一央、高師則行、宇尾基弘、ロスカ・イオシフ・戸塚靖則・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物性歯科理工学分野

○大学院3年 田村一央

大気中の浮遊粒子が健康に与える被害については、既に多くの報告があり、疫学的にも大気汚染物質全体のレベルや、粗大浮遊粒子レベルなどよりも PM2.5 と呼ばれる直径 $2.5\mu\text{m}$ 未満の微細浮遊粒子レベルと死亡率との間に正の相関があることが報告されている。しかし、生体内で発生する微粒子の影響はまだ検討が始まったばかりである。チタンは生体親和性が高く、生体材料として医療分野に広く応用されているが、耐摩耗性に劣るという欠点を有する。人工関節周囲のチタン摩耗粉による組織障害例も多数報告されている。これは、微粒子の構成物質の違いだけでなく、粒子サイズが組織障害の重要な因子であると考えており、私は超微細の粒子 ($1\mu\text{m}$ 未満) に関連した研究を行っている。微細粒子は組織間質に大量に入り込み、粗大な粒子と比較して非常に長い時間をかけて炎症が鎮静化し安定化する。組織間質に入り込んだ粒子は細胞傷害性を発現するが微粒子はマクロな粒子と比較してより重篤な炎症を引き起こす。バイオマテリアルのマクロな生体適合性とは異なり、微粒子による細胞・組織への影響はあまり研究が進んでいない。私はチタン微粒子がその物理的サイズにより炎症を惹起させることを報告し、微粒子による炎症発現の機序の解明を進めてきた。

また、逆にナノ・マイクロ微粒子を機能性インプラントとして用いる試みはまだ基礎研究の段階である。我々のグループが考えているナノテクのバイオ応用には、1]ナノレベルの生体材料の安全性、2]ナノ粒子の目的組織への集積の迅速化、効率性、および 3]生体内での活性・代謝・吸収等の特徴を持った機能性インプラント微粒子の確立が必要である。この目的のために我々は、*in vivo* および *in vitro* での生体組織を用いた実験を行ってきた。生体材料の有害性を比較検討するために、よりヒトの体内環境に近い状態で簡単に実験できるようにヒト生細胞を用いた生物学的アッセイ法を検討してきた。研究の対象として、バイオマテリアルとして期待されている金属、セラミック、ポリマーと、バイオ応用の期待されているカーボンナノチューブで実験を続けている。*in vitro* の生物学的アッセイ法と *in vivo* の動物埋入実験の両面の観点から、対象素材微粒子の化学的、物理的な細胞障害性を検出した。

マクロ大のチタンから 500nm までの各種サイズのチタン微粒子を用い、生体親和性に及ぼすサイズ依存性を調べた。生細胞を使った生化学的アッセイにおいて $3\mu\text{m}$ 以下の微粒子に対し、サイトカイン・活性酸素・プロスタグランジン E2 が有意に検出され、光学・電子顕微鏡による観察では、 $3\mu\text{m}$ 以下のチタン微粒子の貪食が認められた。一方、 $10\mu\text{m}$ 以上の微粒子に対しては細胞の著名な反応は認められなかった。動物埋入試験において $50\mu\text{m}$ 以上のチタン粒子に対しては急性の炎症症状も穏やかで、長

期的には線維性結合組織で覆われ安定した。一方、 $3\mu\text{m}$ 以下の粒子に対しては強い炎症反応が生じ、長期間反応が持続した。実験から $50\mu\text{m}$ 以上のチタン粒子では巨視的サイズのインプラントと同様の生体親和性を示すが、 $10\mu\text{m}$ 以下の粒子では炎症反応を惹起し、長期間にわたり強い炎症反応を引き起こすことが示唆された。ICP 元素分析から、チタン微粒子からのイオン溶出は認められなかったため、溶解イオンとしての化学的効果とは異なる、微粒子の物理的サイズ効果として細胞毒性を示すことが示された。生体親和性の高い他のバイオマテリアルも同様にサイズ効果が現れることが予想され、各種材料を用い実験した。

まずいままで続けてきた構成物質による反応の差異を、金属、セラミックス、ポリマー、カーボンナノチューブを対象とし、同じ手法で比較した。その結果、どの物質もサイズ依存性を示した。金属やセラミックスもサイズが小さくなるほど細胞反応は強くなり、細胞生存率は有意に低下した。これは、物理的なサイズも影響していると考えられる。生体内で無反応であるセラミックスや吸収されるポリ乳酸も $3\mu\text{m}$ 以下になると細胞が反応した。また、イオン化傾向の強い金属の中には金属イオンによる細胞障害作用が強いものがあり表面積が大きくなるほど、組織の障害は強かった。しかし、鉄のイオン溶出量はニッケルよりも大きいにもかかわらず、細胞への影響は小さく、種類による差異も認められた。このような構成物質による反応の違いに関しては、まだ実験中である。

次に生細胞に反応を惹起させる臨界寸法を測定することを目的とし生化学的アッセイを行った。結果として羽田先生に提供していただいた $10\sim 30\text{nm}$ の二酸化チタン/酸化鉄微粒子に対しても細胞は反応し、サイトカイン等の放出を検出した。細胞が粒子にたいして無反応となるかどうかは不明であり、ナノ粒子が分散できているかも怪しいため、断定できない。分散したナノ粒子に対して細胞が無反応になるサイズについて調べていきたい。

今回新たな実験結果として線維芽細胞の細胞反応の違いの検討をとりあげる。ラット腹腔マクロファージの炎症性サイトカインの放出は顕著であった。マクロファージも粒子の大きさによる反応の違いが認められた。そこで、生体の細胞を培養し *in vitro* で実験を行った。ヒト歯根膜由来線維芽細胞やラット線維芽細胞などで、微粒子に対する反応を検討し、微粒子の生体応用への基礎実験を進めている。

線維芽細胞は侵襲を受けたり、食細胞として働くことでサイトカイン等を放出し、炎症反応や骨のリモデリングに影響を与える。微粒子に対する線維芽細胞の反応を解析することは、組織の再生における炎症反応の制御・骨の誘導にとって重要である。今回の研究では、マイクロ・ナノ粒子に対するヒト歯根膜由来細胞の反応を生化学的に検索した。

[細胞]

実験に先立ち、北海道大学歯学部倫理委員会に承認を受けた。歯学部附属病院において、矯正治療に伴う便宜抜歯を受ける14才から22才の5人の患者と家族の同意を得て、抜去された第1小臼歯の歯根膜細胞を採取した。歯根膜細胞はPSN1%,FBS10%添加 α -MEMを用い、 37°C 5% CO_2 の条件で

培養した。実験には対数増殖期の細胞を 3000cells/100 μ l に調整して用いた。

[試料]

粒径 0.5, 3, 10, 50, 150 μ m のチタン粒子の粒子数を調整した後、生理食塩水中に分散させ細胞と混和した。コントロールとして各チタン粒子を培地中に入れ、1週間インキュベーター内に置いた後、ICPでイオン溶出量を測定した。

[方法]

①細胞生存率

1. 粒径の細胞生存率への影響

各チタン粒子の試料の総表面積を 2.5×10^2 mm² となるように調整した。また、粒子の濃度を 100mg/10ml に調整した。試料混和 24 時間後、PBS で洗浄し、 α -MEM と Cell counting Kit (同仁化学研究所) を加え、インキュベーターで 3 時間反応させた。発色後、マイクロプレートリーダーを用い測定波長 405nm で吸光度を測定し、細胞数を計算した。

2. 粒径と粒子濃度の細胞増殖への影響

細胞増殖への影響を調べるために、0.5, 3, 10 μ m の各チタン試料の粒子数を上記のように調整し散布した。1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 時間後に Cell counting Kit を用い、1. と同様の方法で細胞数を測定し、増殖率を比較した。

②サイトカイン産生量

細胞播種 2 時間後に、上清を採取し、ELISA 法で サイトカイン(TNF- α , IL-8)量を測定した。

③細胞形態観察

反応後の細胞を光学顕微鏡と SEM を使い観察した。

[結果]

培地へのチタンイオンの溶出は認めなかった。

① 細胞生存率は明らかなサイズ依存性を示し、粒子が小さいほど生存率は低下した。3 μ m のチタン微粒子に対する 24 時間後の増殖率は、粒子濃度に依存した。また、細胞増殖率は微粒子の存在下ではコントロールと比べ、有意に低下した。(図 1) ② サイトカイン TNF- α , IL-8 の放出量はコントロールに比べ有意に高かった。(図 2) 歯根膜細胞は微粒子が小さいほどサイトカインを多量に放出し、特に 3 μ m 以下で顕著であった。③ 光学顕微鏡での観察では 0.5, 3 μ m の粒子に対しては貪食像を認めた。(図 3) 微粒子存在下では増殖は抑制されていた。

[結論]

微粒子の存在下で歯根膜細胞の生存率や機能は影響を受け、生存率・増殖率の低下およびサイトカイン放出量の上昇と物理的なサイズ依存性を認めた。特に細胞が粒子を取り込む 3 μ m 以下と 10 μ m 以上の間に有意差を認めた。マイクロ・ナノ微粒子は歯根膜由来細胞の生存・増殖に影響を与え、また周囲組織に対して、生体為害作用を引き起こす可能性があると考えられる。

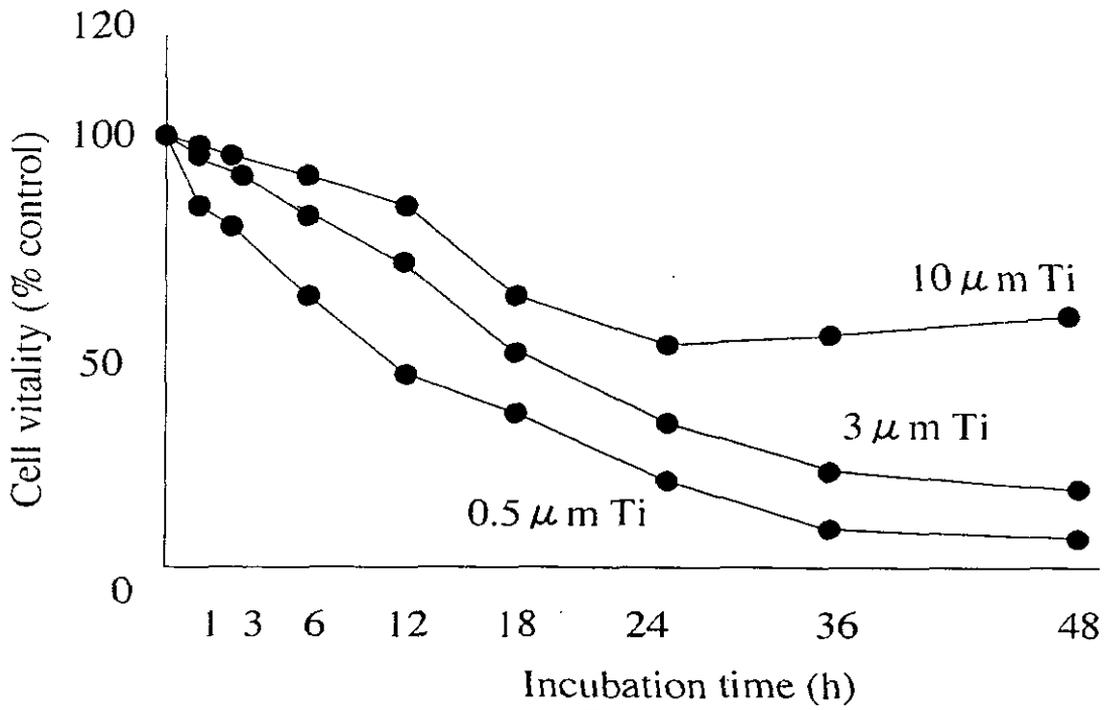


図1 細胞生存率

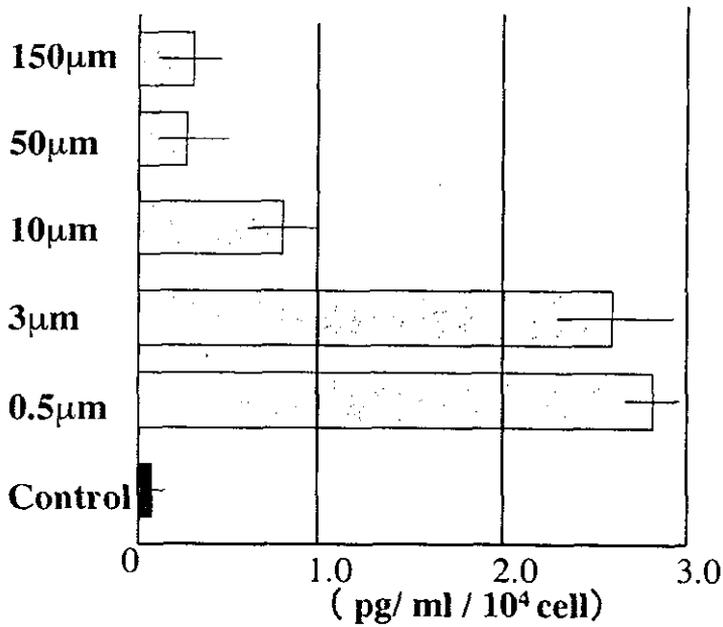


図2 TNF-α 産生量



図3 Ti 粒子の貪食像

今までに行われてきた材料の生体親和性の実験はマクロに対しての反応を見るもので、微粒子に対する反応について検討したものは少ない。また、生体適合性の実験は動物埋入試験もしくは細胞の生存・増殖をみるものが多かった。そこで生体から採取した生細胞を使うことでより生体に近い状態で細胞の分子生物学的機能を検索ができた。また、異なるバイオマテリアルの生体為害性の評価を活性酸素・サ