

イトカイン産生量を用い、定量的に比較できた。これらを元にナノ・マイクロ微粒子を生体応用の障害となりうる生体防御反応の機序について、さらに多角的に検索する予定である。

# Biodegradable polymer microparticles

Iosif Daniel ROSCA<sup>1</sup>, Fumio WATARI<sup>2</sup>, Motohiro UO<sup>2</sup>,  
Tsukasa AKASAKA<sup>2</sup> and Kazuchika TAMURA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Department of Polymer Science, Faculty of Industrial Chemistry,  
Polytechnic University Bucharest, Romania

<sup>2</sup>-Department of Dental Materials and Engineering,  
Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

## *Introduction*

Polymers are increasingly used as implant material or support for drug delivery systems. Microparticle formulations are the most suitable for drug and gene delivery systems, whose performance mainly depends on the particles size distribution and morphology.

Abrasion generated microparticles from the implant can exhibit toxicity even if the bulk material is biocompatible. It is well known that there is a size dependent interaction between microparticles and cells.

Over the past two decades various polymers and formulation technologies were proposed for microparticle manufacture. The most widely used class of biodegradable polymers is the polyesters including poly(lactic acid), poly(glycolic acid) and their copolymers. Different variation of emulsification and solvent evaporation technique is generally used for microparticle manufacture. The quality of biodegradable polyester microparticles depends on a large number of contradictory technological parameters.

The aim of the present study is to identify and quantify the main influence parameters that determine the microparticle size distribution and morphology.

## *Materials*

The biodegradable polymer: Poly(DL-Lactide-co-Glycolide), copolymer composition 50:50, Mw = 45000-75000, Lactel BP 0100 (PLGA), Poly(L-Lactide) Mw 85000-16000, Lactel BP 0600 (PLA) supplied by Sigma. Suspension agent poly(vinyl alcohol) (PVA) with different molecular weight and 80-90% degree of hydrolysis was obtained from Wako Chemicals.

All chemicals were used without further purification.

## *Methods*

The emulsion solvent evaporation method presented in figure 1, consists of emulsification of the polymer solution (organic phase) in deionized water in presence of poly(vinyl alcohol) as suspending agent (aqueous phase). For small particles (~1µm) high-speed homogenizer (Heidolph DIAX 900) was used for emulsification. The emulsion was stirred overnight on a magnetic stirrer plate to allow the evaporation of solvent. Microparticles were recovered by centrifugation (3500rpm) for 5min, washed once with deionized water to remove PVA.

The size distribution of the washed particles was measured with laser light diffraction particle analyser. (Shimadzu SALD 7000). Microparticle morphology was investigated by SEM (Hitachi 4000).

Microparticles with wide size distribution were fractionated by field flow fractionation (FFF) technique, resulting two or three fractions of narrow distribution particles.

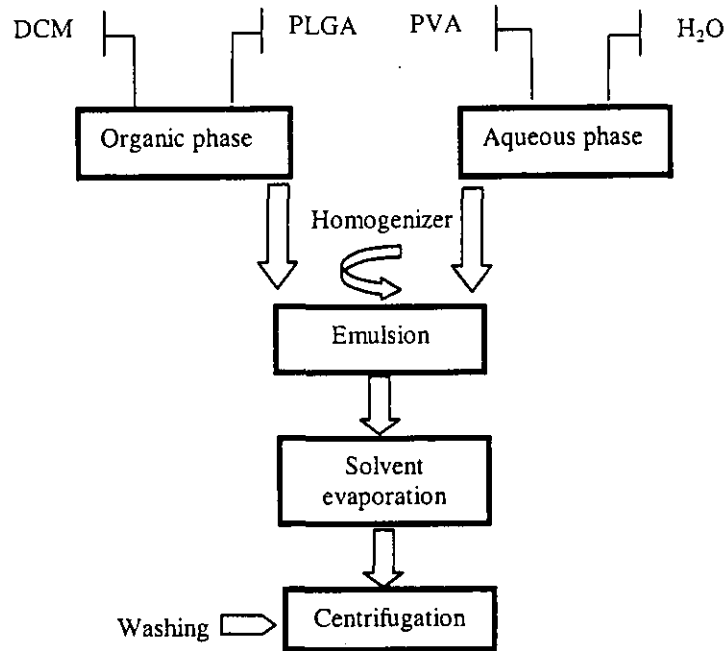


Fig. 1. Schematic of emulsion solvent evaporation method.

## Results and discussions

### Particle size distribution

Controlled release applications demand precise particle dimensions and narrow distributions. Particle size distribution mainly depends on the following parameters:

- Polymer concentration in organic phase. The lower the concentration the smaller the particle diameters, but low concentration induce low encapsulation efficiency.
- Surfactant concentration. Increased PVA concentration yield decreased particle dimension, but high surfactant concentration have detrimental effects on the particle hydrophobic character, lowering the cell uptake rate
- Homogenizer speed. Higher share stress produce smaller particles, but high-energy emulsification my have negative effects on the encapsulated substance.

There are also some technological parameters that have great influence on the particle size distribution. Static mixing elements allow more efficient stirring by avoiding the central vortex (figure 2) and air bubble formation, responsible for wide particle distribution (figure 3) by migration of the surfactant from the liquid-liquid interface to the liquid-air interface.

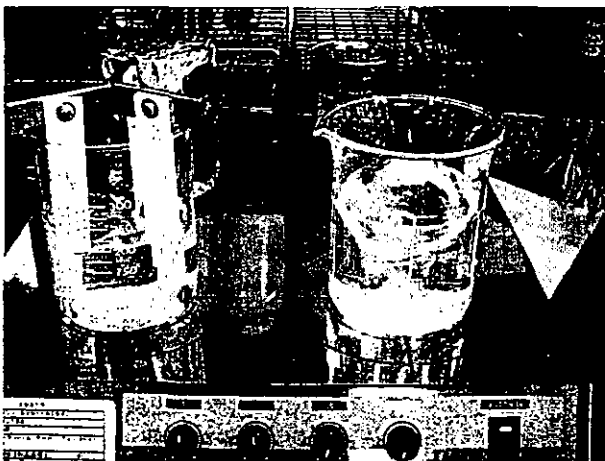


Fig. 2 Improved mixing efficiency by using static elements

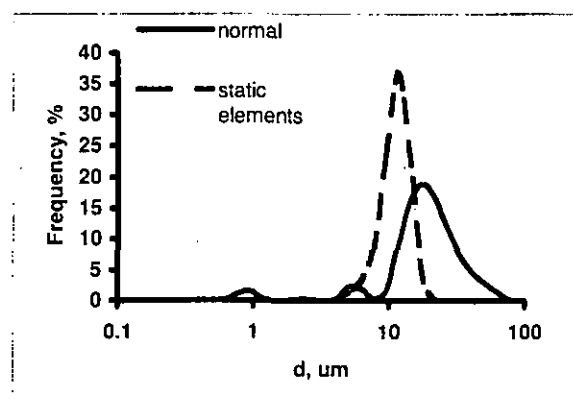


Fig.3 PLGA particle size distribution dependence on the stirring system

For microparticles with mean diameter 1µm or smaller high-speed homogeniser should be used.

In Table 1 are presented values of the main parameters for obtaining particles in the 1µm range.

Table 1. Main parameter values for 1µm sized particles

Parameter	Value
Polymer concentration in the organic phase, %w/v	0.25-0.5
PVA concentration in the aqueous phase, %w/v	0.2-1
Homogenizer speed, rpm	11000
Emulsification duration, min	2
Magnetic stirrer speed, rpm	750

In figure 4 and 5 are presented representative particle micrograph and size distribution.

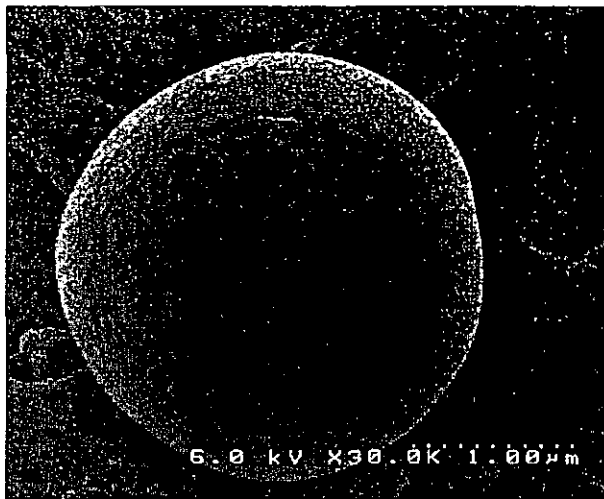


Fig. 4 SEM micrograph of PLGA particle\*  
\* experimental conditions as in table 1

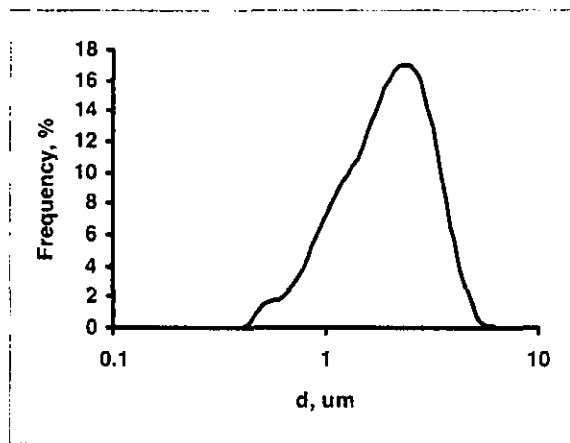


Fig. 5 PLGA particle distribution\*.

In order to avoid using high-speed homogenizer, particles with wide distribution obtained at low share stresses, can be separated in several narrow size distribution fractions by field flow fractionation channel. In figure 6 is presented the FFF channel designed in our laboratory that allows preparative particle fractionation. Figure 7 shows the initial size distribution and the distributions of the separated fractions.

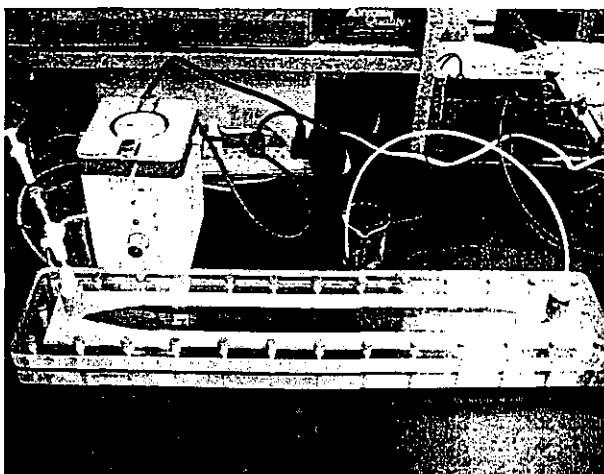


Fig. 6. FFF Channel

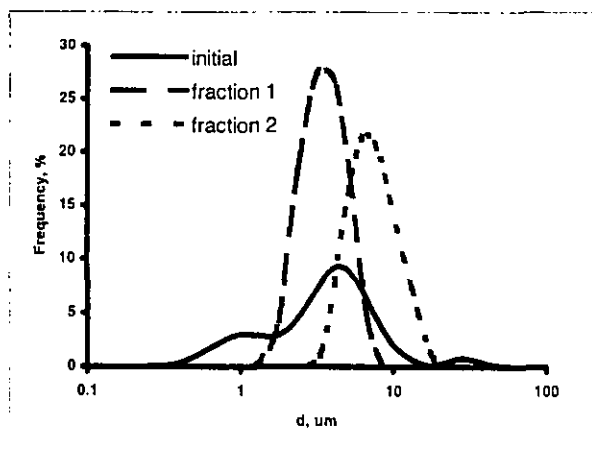


Fig.7 Fractionated particle sample

### *Particle morphology*

Particle surface morphology has an important role in the controlled release mechanism. SEM micrographs of PLGA particles show different type of surface morphologies (figure 8,9). In order to reduce initial burst release particle should have smooth surface. Porous surface or small particle agglomerations (figure 9) are caused mainly by low degree of hydrolysis of APV.

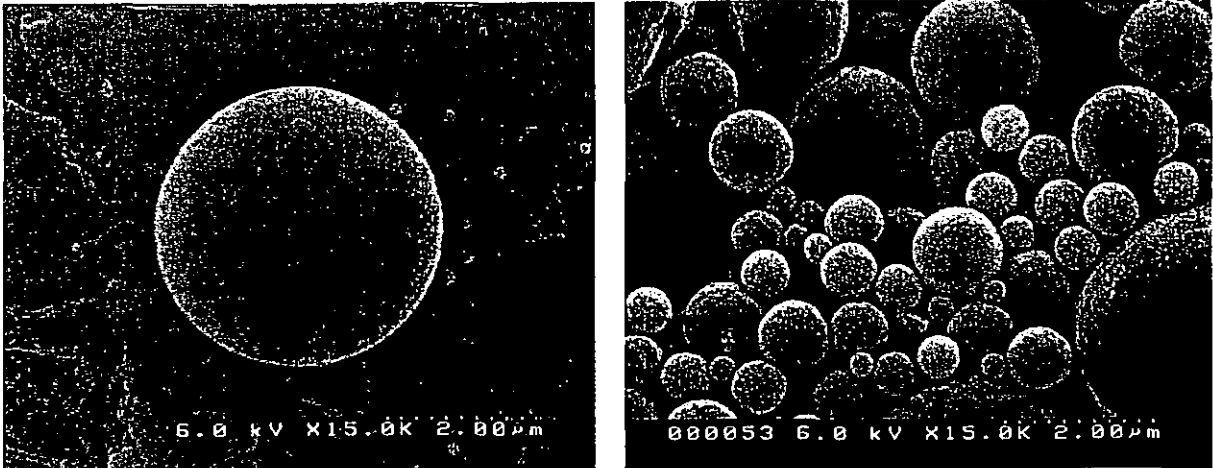


Fig. 8 PLGA particles obtained with 90% degree of hydrolysis PVA

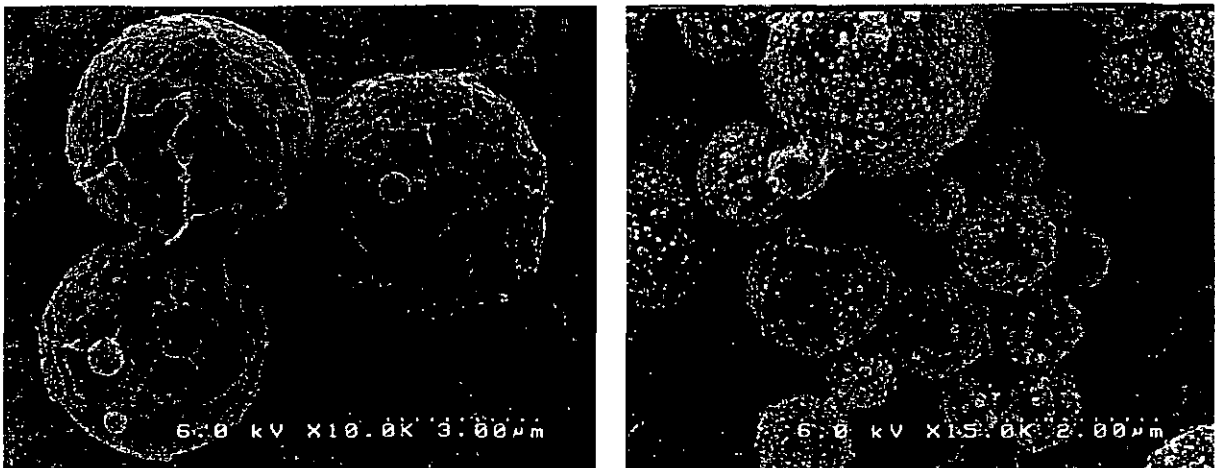


Fig. 9 PLGA particles obtained with 80% degree of hydrolysis PVA

### **Conclusions**

In the present study qualitative and quantitative influence of different parameters were assessed in order to obtain PGLA microparticles with controlled size distribution and morphologies.

Increasing mixing efficiency by adding static elements to the stirring system result in narrower particle size distribution.

Broad size distribution particles can be separated in several narrow distribution fractions by field flow fractionation technique

カーボンチューブならびにカーボンナノロッドはマクロファージを活性化する

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座<sup>1)</sup>、口腔健康科学講座<sup>2)</sup>、東北大学大学院工学研究科<sup>3)</sup>、北海道大学大学院理学研究科<sup>4)</sup>

柴田 健一郎<sup>1)</sup>、藤田真理<sup>1)</sup>、木浦和人<sup>1)</sup>、黒岩理暢<sup>1)</sup>、安田元昭<sup>1)</sup>、佐藤義倫<sup>3)</sup>、田路 和幸<sup>3)</sup>、古月文志<sup>4)</sup>、亘理文夫<sup>2)</sup>

#### A. 研究目的

前回の本研究会において、CHAPS で可溶化処理を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がマクロファージを活性化し、TNF- $\alpha$ 産生を誘導すること、さらにカーボンナノロッドが Toll-like receptor 2 (TLR2)で認識されることを報告した。

今回は可溶化処理をしていないカーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブについて同様な実験を行ったので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. サンプル

HSW2: 長さ数十ミクロンの精製 (純度 95%以上) 単層ナノチューブ

R102: ウニ型 SWCNTs の合成されていない煤

R2: ウニ型 SWCNTs

NGC3: CeC2 がグラファイト層に覆われた球状の粒子

817ND: ナノロッド

これらのサンプルを 6 N の塩酸処理 (R102, R2 以外) したのち、蒸留水に 0.2 mg/ml の濃度で分散させた。

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% FBS を含む RPMI 1640 培地 200  $\mu$ l 中に  $5 \times 10^5$  個の THP-1 細胞を懸濁させ、原液(最終

濃度 10  $\mu$ g/ml)、10 倍希釈液(最終濃度 1  $\mu$ g/ml)、

100 倍希釈液(最終濃度 0.1  $\mu$ g/ml)の 10  $\mu$ l で 16 時間刺激した。遠心により上清を集め、ELISA 法で TNF- $\alpha$ 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- $\kappa$ B 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (pNF- $\kappa$ B luciferase reporter plasmid) とともに human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に遺伝子導入し、原液(最終濃度 10  $\mu$ g/ml)、10 倍希釈液(最終濃度 1  $\mu$ g/ml)、100 倍希釈液(最終濃度 0.1  $\mu$ g/ml)の 10  $\mu$ l で 6 時間刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. マウス脾臓細胞の活性化

C57BL/6 マウスから脾臓を無菌的に取り出し、通法に従い脾臓細胞浮遊液を調製した。平底の 24 穴マイクロプレートに 1 ウェルに  $1 \times 10^7$  個脾臓細胞を加え、原液(最終濃度 10  $\mu$ g/ml)、10 倍希釈液(最終濃度 1  $\mu$ g/ml)、100 倍希釈液(最終濃度 0.1  $\mu$ g/ml)で 16 時間刺激した。全 RNA を調製し、RT-PCR 法により TNF- $\alpha$ の mRNA の発現を調べた。

#### C. 研究結果ならびに考察

5種類のサンプルの中で、HSW2 は最も強く THP-1 細胞を活性化し、TNF- $\alpha$ 産生を誘導した。他のサンプルも活性化能を有していたが、そのレベルは HSW2 に比べて非常に弱いことがわかった。さらに、これらのサンプルすべてがマウス脾臓細胞の活性化し、TNF- $\alpha$ の mRNA の発現を誘導したが、そのレベルは HSW2 が最も強いことがわかった。

これら 5 種類のサンプルすべてが TLR2 により認識されることはなかった。

以上の結果から、今回用いたサンプルは前回のサンプルに比べて、マクロファージ活性化能は弱く、また、TLR2 により認識されないことがわかった。この相違はサンプルの処理方法の違いによるのかもしれない。

今回と前回の結果で共通していることは、活性の強さには相違がみられるものの、カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブは単球・マクロファージを活性化する能力を有している、すなわち生体にとって異物として認識されるということである。

# PANゲルの力学物性の向上とNafionの曲げ変形の制御性及び複雑化

岐阜大学工学部人間情報システム工学科

○野方文雄・玉川浩久

## 1. 緒言

これまで我々はアクチュエータ利用を目的として高分子ゲルに関する研究を行ってきた。特にポリアクリロニトリルゲル(PANゲル)と呼ばれる伸縮性のゲルとNafionと呼ばれる曲げを示す膜状ゲルに注目してきた。前回の報告ではPANゲルが熱硬化すること、Nafionを2枚重ねることで発生力向上が可能である事を示した。今回の報告では、(i)硬化させたPANゲルの定量化した詳細な力学的性質、(ii) Nafionの曲げ変形の制御性、(iii)Nafionの曲げの複雑化、について報告する。既にこれらゲルの特徴的な性質は報告してきたので以下その説明は省いて、行った実験とその結果について報告する。

## 2. PANゲルの酸/塩基中における伸縮、耐久性、強度、及び発生力

PANゲルのアクチュエータ利用の為にはその高伸縮性のみならず、厳しい環境下での耐久性が重要となる。PANゲルはPAN繊維を高温下で焼成した後に高温塩基中で加水分解することで得られる。PANゲルはその焼成温度、焼成時間、加水分解時間により明らかにその性質を変化させるが、アクチュエータ利用には当然最も優れた性質を持つPANゲルを利用すべきである。以下、様々な条件下で作製したPANゲルの性質を定量的に測定し、どのPANゲルが優れているか考察する。ただし、ここに示す実験結果はあくまで一例であり、同じ条件下で作製したPANゲルは極めて類似した傾向の性質を持つが、100%全く同じ性質を持つわけではない。つまり同じ条件下で作製したPANゲルでも互いにならずかではあるが性質が異なり、これは避けられない。

### 2. 1. PANゲルの伸縮と耐久性

まず最初に、大気中においてPAN繊維を220、235、250度Cで焼成してゲル化させる。この繊維状PANゲルを80度Cの1M濃度NaOH中で1、2、4、8時間で加水分解して高伸縮性を持つ繊維状PANゲルに変化させる。そしてHClとNaOH中におけるこのPANゲルの伸縮性を評価した。その方法は以下の通りである。これらPANゲルを1MのNaOH中に浸漬し、2分後にその長さ( $L_{NaOH}$ )を測定する、その後すぐにこのPANゲルを1M濃度のHCl中に浸漬してやはり2分後にその長さ( $L_{HCl}$ )を測定する。式(1)に従ってその伸縮比( $R_{length}$ )を算出する。

$$R_{length} = L_{NaOH} / L_{HCl} \quad (1)$$

図1にその結果を示す。220度Cで焼成したPANゲルは焼成時間が3時間程度までは焼成時間が長くなるほど伸縮比は大きくなるが、4時間以上焼成した物では伸縮比の増加は見られない。更に焼成時間が3時間程度までのPANゲル試料では加水分解時間が長くなればなるほど著しく伸縮比が大き

くなっている事がわかる。ただし、4時間以上焼成した物では伸縮比の増加の程度が低下しているが他の温度下で焼成した物に比べるとそれでも大きい。4時間以上の焼成を行ったPANゲル試料の伸長比の増加の程度が低下するのは長時間の焼成によりPANゲルが硬化したためと考えられる。8時間以上加水分解した試料はいずれもNaOH中での強度低下が著しいばかりか、分解さえする。235度C及び250度Cで焼成したPANゲル試料の振舞いは220度Cで焼成した物と異なり、焼成時間が長くなればなるほど伸縮比は低下する。これは高温下では短時間の焼成でPAN繊維の硬化が非常に進んでしまうためと考えられる。実際に恒温下で焼成したPANゲルのほとんどは加水分解1時間と8時間の試料間の伸縮比に大きな差は生まれていない。

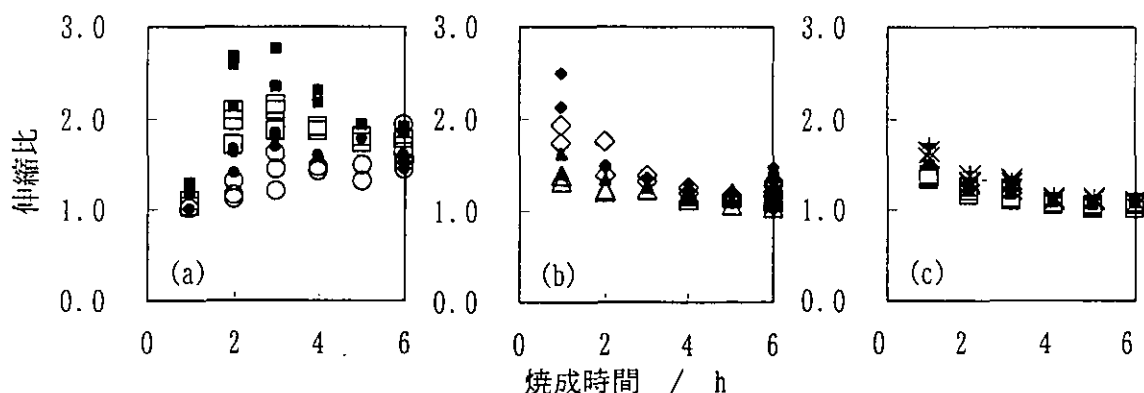


図1 PANゲルの伸縮比 (伸縮比) = (NaOH中のPANゲルの長さ) ÷ (HCl中のPANゲルの長さ) (a) 220度C下焼成し加水分解時間は(i)○:1時間、(ii)●:2時間、(iii)□:4時間、(iv)■:8時間 (b) 235度C下焼成し加水分解時間は(i)△:1時間、(ii)▲:2時間、(iii)◇:4時間、(iv)◆:8時間 (c) 250度C下焼成し加水分解時間は(i)□:1時間、(ii)■:2時間、(iii)×:4時間、(iv)+:8時間

本研究で目標としている事はPANゲルのアクチュエータ利用である。そのためには伸縮比が大きなPANゲルが望ましく、その点から言えば220度Cで焼成したPANゲルは利用価値がある。しかし、220度Cで焼成したPANゲルは伸縮性に富む一方で加水分解時間が長くなると著しく強度が低下するので、実際にアクチュエータに利用には向かない。図1にある伸縮比の結果とも合わせて考えて、比較的伸縮に優れ硬化により耐久性があると考えられる235度C下で2時間及び3時間焼成した試料と250度C下で1時間焼成した試料に関して以下更なる実験を行った。比較の為に、硬化の度合いが低く、耐久性は劣ると考えられる220度C下で2時間焼成した試料に関しても同様な実験を行った

## 2. 2. PANゲルの強度

220度C下で2時間焼成した試料、235度C下で2時間及び3時間焼成した試料、250度C下で1時間焼成した試料に関して引っ張り強度試験を行なった。PANゲルは収縮状態では極めて優れた強度があることは実験をせずとも明確なので、NaOH中で伸長状態にあるこれらPANゲルに対して引っ張り試験を行なった。引っ張り試験はPANゲルの破断が引き起こされるまで行なった。図2はその結果である。焼成温度が高い、あるいは焼成時間が長いほど強度が上昇する傾向にある事がわかる。しかしなが



ら直感的にも理解出来る通り、強度が上昇した試料は破断までの歪は低下傾向にあると言える。235度C下で3時間焼成した試料はこれら4試料の中で最大歪に耐え、最大張力にも耐えているので最も耐久性に優れた性質を持つようにも考えられるが、冒頭で述べた通り、同じ条件下で作った試料であっても個々の試料が全く同じ振舞いを示すという事は無く、図2の結果は典型的なものではあるがあくまで一例に過ぎない。従って「235度C程度で2、3時間焼成したPANゲルは高歪、高張力に耐える優れた強度を持つ」と述べるにとどめる。

### 2. 3. PANゲルの発生力

2. 2節で用いたPANゲルに関して発生力測定を行なった。NaOH中で十分伸長させたPANゲルをHCl中で収縮させることで生まれる発生力(引っ張り力)を測定した。実際にここで用いたPANゲルの伸縮性について述べておく。用いたPANゲルは2. 2節で用いたものと同じ種類の物であり、その伸縮の傾向は図1に示した物とほぼ一致する。しかし、100%定量的にも一致するという事はありえない。従って、実験結果考察の為に重要なデータとして、本測定で実際に用いたゲルの伸縮比( $R_{length}$ )には以下のような関係があることを述べておく。 $R_{length}$ の関係：[220度Cで焼成-2時間加水分解のPANゲル] > [235度Cで焼成-2時間加水分解のPANゲル] > [235度Cで焼成-3時間加水分解のPANゲル] > [250度Cで焼成-1時間加水分解のPANゲル]。図3が発生力の結果である。220度C焼成2時間加水分解のPANゲルは2. 2節に見られるように強度に関しては劣るが、発生力は大きい。これは伸縮比が大きい事によるのであろう。逆に高強度であった250度C焼成1時間加水分解のPANゲルの発生力は極めて低かった。これは伸縮比が小さい為であると考えられる。

これらの結果より言える事は明らかに焼成温度の上昇、焼成時間の延長はPANゲルの強度を増加させるが、伸縮比を低下させてしまうため発生力の低下に結びつく。得られた結果からアクチュエータ材料として丁度良い性質を持つPANゲルは235度C下で2、3時間焼成した物であると推測できる。

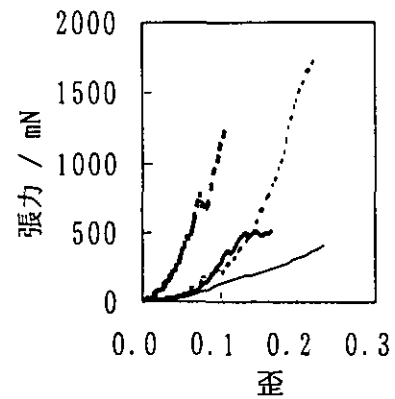


図2 PANゲルの張力-歪の関係  
細線:220度C焼成-2時間加水分解、太線235度C焼成-2時間加水分解、点細線:235度C焼成-3時間加水分解、太点線250度C焼成-1時間加水分解

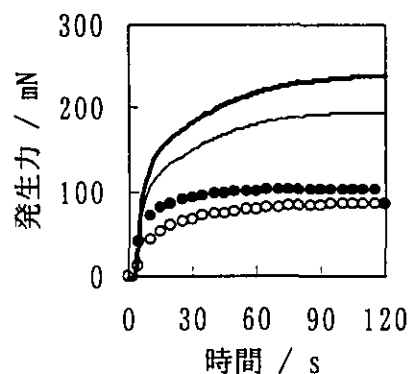


図3 PANゲルの発生力-時間の関係 時刻0sはPANゲルをHCl中に入れた時刻である  
細線:220度C焼成-2時間加水分解、太線235度C焼成-2時間加水分解、白丸:235度C焼成-3時間加水分解、●:250度C焼成-1時間加水分解

### 3. Nafion の曲げ変形の制御性と曲げの複雑化

これまでも述べてきた通り、Nafionは僅か1Vの印加電圧で正極方向に図4の様に大きく曲がる。しかしながらその変形制御は容易ではなく、印加電圧の極性方向を変えれば逆方向の曲げを引き起こす事は可能であるものの、常に正確に従うという訳には行かない。より正確な変形制御の為にはゲルの変形が具体的にどのような形で支配されているかを知る必要があり3. 1節に述べた実験を行なった。更に、アクチュエータ利用の為には更に複雑な形状、あるいは複雑な運動をするNafionが望まれるので3. 2節に複雑な動きを可能とする方法を紹介する。

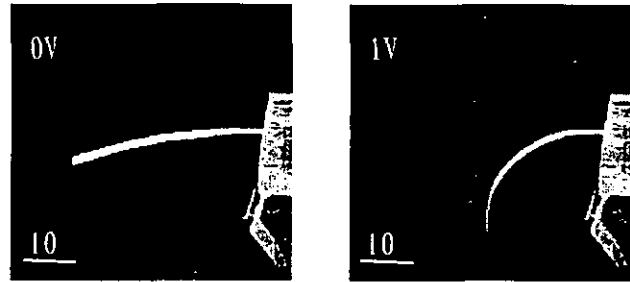


図4 Nafionの1V印加電圧化における変形  
曲げ方向が印加電圧の正極方向

3. 1節に述べた実験を行なった。更に、アクチュエータ利用の為には更に複雑な形状、あるいは複雑な運動をするNafionが望まれるので3. 2節に複雑な動きを可能とする方法を紹介する。

#### 3. 1. Nafionの曲げ変形制御性

図4に示す様に片持ち梁の状態でのNafionを固定し、電圧を印加してその曲率と印加電圧及び流れた電流の相関を調べた。しかし、電圧の大小によりNafionの曲率を制御する事は出来なかった。次に我々は電圧印加時に流れる電流と曲率の関係について調べた。図5は一定1V電圧を印加した場合のNafionに流れる全電荷と曲率の関係である。電荷が流れ始めてしばらくの間は全電荷と曲率の間にはほぼ直線関係があり(破線はグラフに合わせて直線をひいたものである)、1V以下の様々な一定印加電圧の場合でも同様な現象が例外なく観測された。また印加電圧を時刻と共に一定上昇する電圧に変えても同様であった。従来から

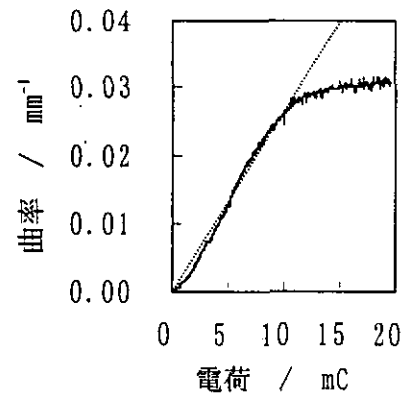


図5 印加電圧1V下に於ける  
Nafionに流れる全電荷とNafion  
の曲率の関係 破線は後から加  
えたもの

Nafionの曲率と電荷の間には相関があることが知られており、しかも図5からその関係は極めて単純であることが分かる。この関係を利用すればNafionの変形制御が可能となる。しかし、時間と共に次第にこの直線関係は失われてしまう為これを克服することが次の課題である。

#### 3. 2. Nafionの曲げ変形の複雑化

##### 3. 2. 1. Nafionの熱成型

Nafionをアクチュエータとして用いるには図4のような単純な動きだけでなく、複雑な動きも要求される。しかし、Nafionは成型加工をして複雑な形状を持たせるという事が出来ない。我々は240度C程度の熱をしばらくNafionに印加する事で限られた形状ではあるが成型加工が出来る事を見出した。図6にコイル状に成型したNafionの変形挙動を示す。印加電圧の極性を変える事でNafionの

「巻き取り-展開」が可能である。

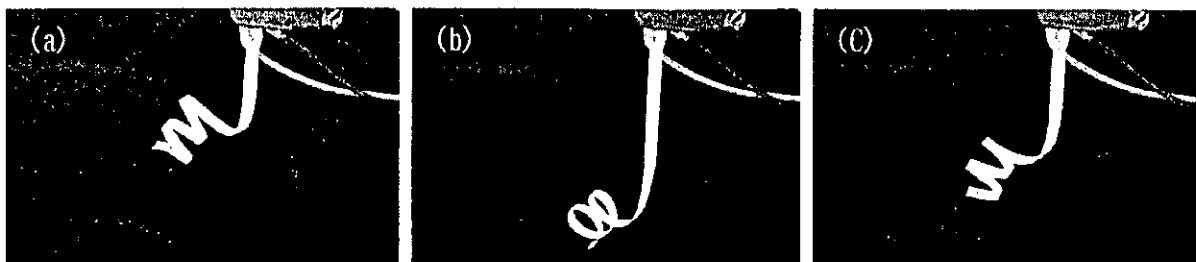


図6 (a)印加電圧0V (b)1Vの電圧を印加 (c)極性を逆にして1Vの電圧を印加

### 3. 2. 2. Nafion表面メッキのパターン化

Nafionを熱成型せずとも図4に示すような梁状のNafionを何枚か組み合わせ、それぞれ独立に電圧を印加すれば結局複雑な動きは可能になる。しかしそれでは最終的に出来上がったNafionアクチュエータの構造が余りに複雑になりすぎる。可能であるならば唯一枚のNafionを用いて複雑な変形運動を可能にしたい。その方法の一つとしてNafion表面に目的に応じた動きを持たせるように複雑な電極パターンをメッキする方法が挙げられる。

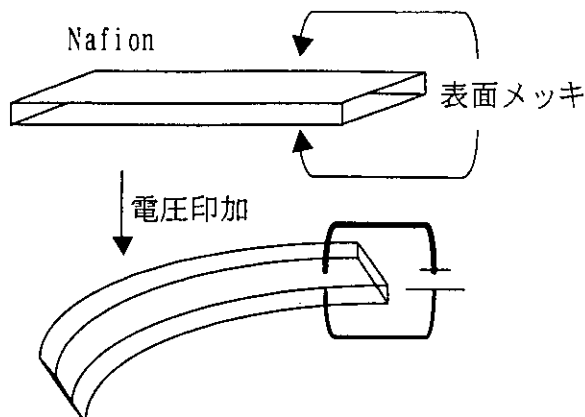


図7 表面メッキ後に電圧を印加されて曲げられたNafion 正極方向に曲がっている

図4の梁形状Nafionは図7の様にNafionの両表面に金属メッキを施し、このメッキ面を電極として電圧を印加する事で一般に正極方向への曲げが可能となる。今回一枚のNafion表面に特定のパターンを持つメッキを施してその曲げ変形の複雑化を行なった。

図8にあるようにNafion表面の斜線部のみをメッキする。Nafion中央部にはメッキ面がない為に図8(b)の様にNafionの左右で印加電圧の極性を反対にするとが可能となる。このような手法を用いれば左右逆方向のNafionの曲げが期待される。実際の写真が図9である。なおここで用いたNafionは側面からNafionの向こう側の曲げ挙動も見えるようにする為、図9(a)にあるように櫛型である。図9(b)、(c)の特に白丸で囲んだ部分に特に注目してみると、手前側と向こう側で逆方向への動きが引き起こされている事がわかる。

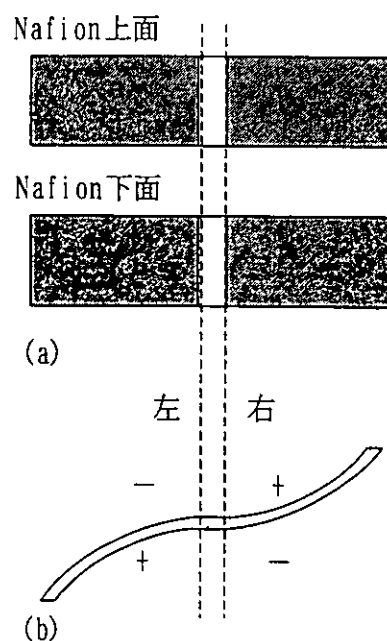


図8 (a)Nafion所下面のメッキ(斜線部)のパターンと(b)印加電圧下の曲がったNafionの側面図

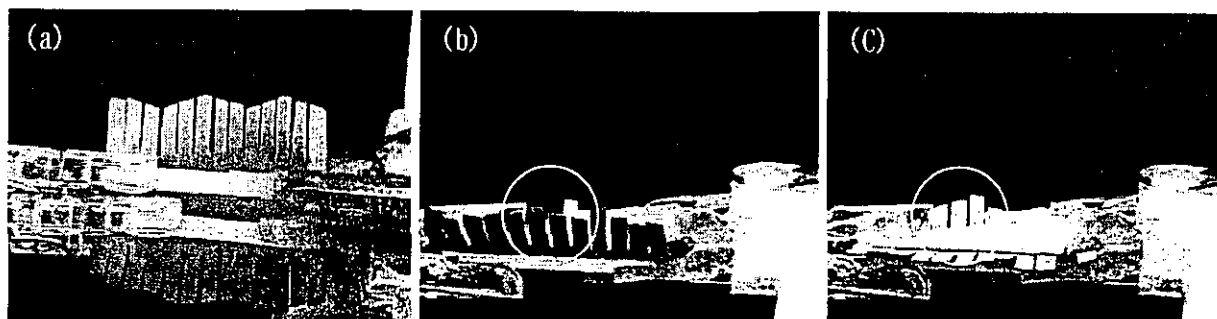


図9 図8に示したメッキを施したNafionを(a)上面あるいは(b)(c)側面から見た図 (a) 電極にセットされたNafion (b)手前上面が正極、下面が負極、向こう側上面が負極、下面が正極 (c)手前側上面が負極、下面が正極、向こう側上面が正極、下面が負極

### 3. 結論

#### PANゲルに関して

PANゲルは焼成が進めば強度が上昇し、耐久性も良くなるが、伸縮率は低下する。他方、加水分解が進めば伸縮率は上昇するが、強度及び耐久性が低下するというジレンマがあった。今回報告した実験結果より235度C程度で焼成し、2-3時間程度で加水分解したPANゲルが非常に強度、耐久性、伸縮性に優れた物になることが強く示唆された。

#### Nafionに関して

Nafionの曲げの印加電圧制御による曲げの制御は極めて困難である。しかし、今回行なった実験より、曲げの比較的初期の段階ではNafionの曲率とNafion中に流れる全電荷量との間に比例関係がある事が見出された。

Nafionに複雑な運動をさせる方法として(i)熱成型と(ii)表面メッキのパターン化を提示した。

(i)熱成型 Nafionはもともとシート状で既に成型された状態で販売されており、成型は困難であるが240度C程度の高温を与える事である程度の熱成型が可能であることがわかった。そして実際に比較的複雑な運動を引き起こす事が可能であった。

(ii)表面メッキのパターン化 Nafion表面メッキのパターン化によってやはり比較的複雑な運動を引き起こす事が可能であることがわかった。

上記いずれの方法でもNafionに印加すべき電圧は僅か1Vであり、運動は複雑化しても梁状Nafion同様に低消費電力で実現可能である。

# カーボンナノチューブを利用した再生医療 —生体材料scaffoldへの応用—

北海道大学大学院歯学研究科

○柏崎晴彦・高師則行・田村一央・木浦和人・戸塚靖則・井上農夫男

## 1. 目的

組織再生に不可欠な3つの要素は、細胞、液性因子（成長因子）、そして細胞の足場scaffoldである。

scaffoldの表面を化学修飾することでscaffoldの高機能化が期待できる。例えば、scaffoldの表面に修飾剤を固定し、その修飾点に再生に重要な液性因子をリガンドとして固定できれば、液性因子の徐放化により効率のよい再生医療が可能になる。カーボンナノチューブがscaffoldの表面修飾剤として機能できれば、その再生医療に対する応用範囲は広がる。

scaffoldの役割と求められる特性は、1) 細胞接着の場、2) 再生組織の形態の決定と再生の場の確保、3) 生体吸収性、4) 生体に悪影響をあたえないこと、である。そこで、まず4)に関するカーボンナノチューブの影響を検討した。

## 2. 実験方法

まずカーボンナノチューブが生体の細胞に対し細胞死を誘導するか否かを調べた。

ヒト由来マクロファージ系細胞株であるTHP-1細胞を、500  $\mu$ lの10%牛胎児血清添加RPMI1640培地と共に $1 \times 10^6$ 個ずつ24穴マイクロプレートに播種し、20  $\mu$ lのカーボンナノチューブ懸濁液の原液、10倍希釈液、100倍希釈液で24時間刺激した。遠心により上清を集め、LDH assayにより細胞死の有無を調べた。

## 3. 結果・今後の展望

現在assayの至適条件を決めている段階で結果がまだでていないが、発表当日には結果を示したいと思う。カーボンナノチューブの細胞への傷害性がないことが確認できたなら、顎骨再生を念頭に置いて研究を進めたいと思う。その場合、scaffoldを生体吸収性の $\beta$ -TCPとし、その表面をカーボンナノチューブでcoatingして、BMP等の増殖因子との複合体の作成が可能か検討したいと考えている。

# 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

北海道大学大学院歯学研究科，理学研究科，東北大学大学院工学研究科

○田村正人，田路和幸，古月文志，鈴木豊典，戸塚靖則

## 1. 目的

多層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，精製した多層ナノチューブを樹立された骨芽細胞様細胞などの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多層カーボンナノチューブの影響について検討を行った。

## 2. 方法

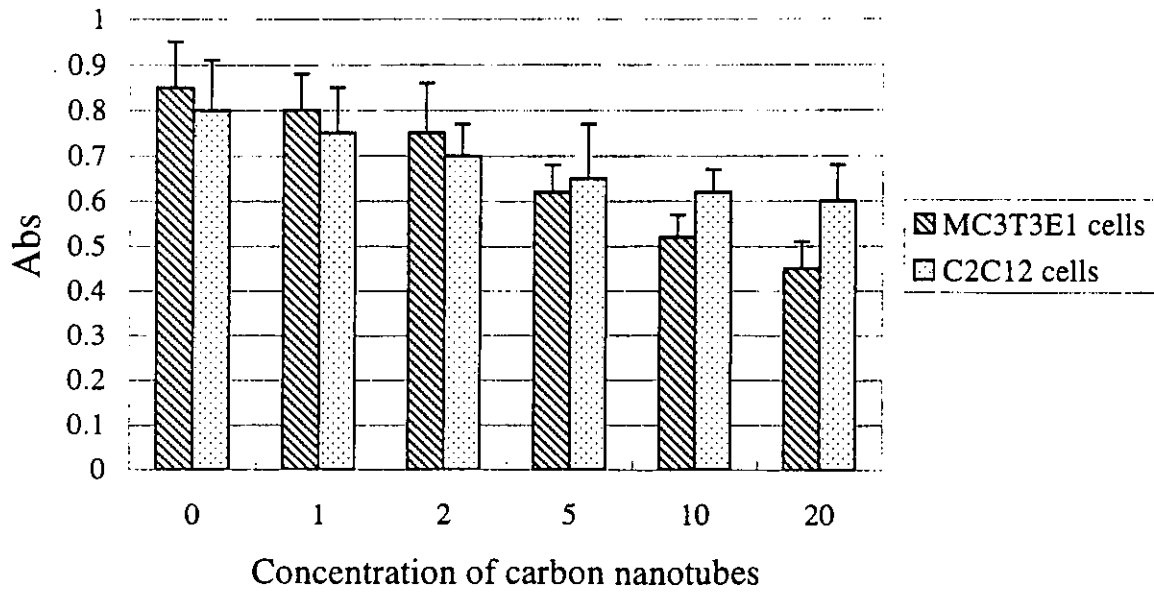
マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞，マウス筋芽細胞C2C12細胞を，10%ウシ胎児血清を加えた $\alpha$ -MEM培地にて5%CO<sub>2</sub>，95%Airの条件下にて培養用プラスチックdish上で培養した。この細胞を， $1 \times 10^5$ /mlの濃度で24-well dishに播種し24時間後にPhosphate buffer saline (PBS)に懸濁させた多層ナノチューブ（NanoLabo社製塩酸処理，#A1）を種々の量培地中に添加し，引き続き細胞培養を行なった。細胞増殖に対する効果を明らかにするため，48時間後に生細胞数をMTT法を用いて測定した。また，細胞の機能に対する影響について，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について活性染色法を用いて測定を行った。

## 3. 結果ならびに考察

MC3T3-E1細胞において，塩酸処理した多層ナノチューブ（#A1）を添加後48時間後に増殖した全生細胞数は，添加した多層ナノチューブ（#A1）の濃度に依存して減少した（図1）。C2C12細胞においても，同様に多層ナノチューブ（#A1）を添加すると，細胞数が減少したが，その減少の程度はMC3T3-E1細胞のそれよりも低かった（図1）。塩酸処理した多層ナノチューブ（#A1）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，加えた多層ナノチューブの量が増えるにしたがって低下した。これらの結果は，多層ナノチューブは細胞培養系においては，細胞に対して増殖を抑制させる作用もしくは細胞死を誘導する作用がある可能性を示唆した。また，アルカリフォスファターゼの低下については，その酵素活性の低下が特異的な作用か，否かについて，現在検討を行っている。また，ナノファイバーやナノチューブのいかなる分子機構によって，これらの作用が細胞に対して及ぼされるのか検討を要すると考えられる。

☒ 1

Effects of carbon nanotubes on cell viabilities in MC3T3E1 cells and C2C12 cells in culture



# カーボンナノチューブを用いた複合材料の作製と評価 およびカーボンナノカプセルの生体内挙動の調査

○宇尾基弘<sup>1</sup>・赤坂 司<sup>1</sup>・Rosca Iosif Daniel<sup>1</sup>・亘理文夫<sup>2</sup>

横山敦郎<sup>2</sup>・川崎貴夫<sup>3</sup>・田村一央<sup>3</sup>・戸塚靖則<sup>3</sup>

(北大院 歯学研究科 <sup>1</sup>歯科理工 <sup>2</sup>補綴一 <sup>3</sup>口外二)

佐藤義倫・田路和幸 (東北大院 工学研究科)

大森 守 (東北大 金材研)

## 1. 目的

カーボンナノチューブと金属またはポリマーとの複合材を作製し、繊維強化金属/プラスチックのような高比強度の生体材料を合成することを目的とした。

またカーボンナノカプセルは希土類炭化物 ( $CeC_2$ など)の周囲をグラフェンシートで覆われた直径20~30nmの粒子である。このナノカプセルは内部に希土類を含有し、周囲をグラフェン構造で覆われるため、希土類をトレーサーとして生体内でのカーボンナノ粒子の挙動を調査するのに好適である。そこでこのナノカプセルをラットに投与し、生体内での蓄積挙動を調査した。

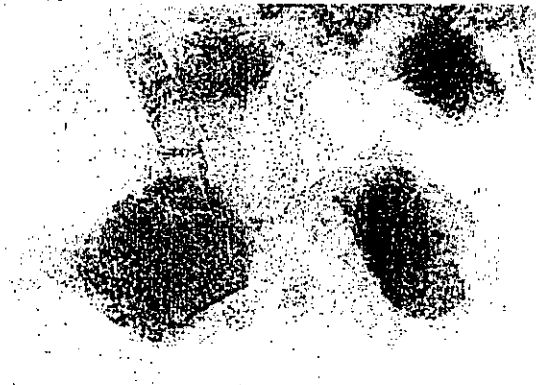


図1 カーボンナノカプセルのTEM像

## 2. 方法

### 【CNT含有複合材料の作製と評価】

多層CNT (Nanolab社製) と水素化チタン (住友シチックス製) をCNT含有量が0, 5, 10, 15wt%となるよう秤量・メノウ乳鉢で混合し、放電プラズマ焼結装置 (SPS) で焼結した後、断面が1mm角の棒材に加工した。焼結条件は表1の通り

表1 Ti/MWCNT複合材のSPS焼結条件

MWCNT含量 (wt%)	圧力 (MPa)	温度 (°C)	保持時間 (分)
0	40	1070	5
5	120	1075	5
10	120	1045	5
15	120	990	5



得られた試験片は万能試験機（インストロン：4204）により支点間距離15mm、クロスヘッドスピード0.5mm/minの条件下で3点曲げ試験を行い、強度を評価した。また断面をSEM（日立：H-2380）にて観察するとともに、XRD（リガク：Multiflex）により結晶相の同定を行った。

#### 【ナノカプセルの生体内挙動の評価】

Ce含有カーボンナノカプセル（以下Ce-CNC）を無菌的に生理食塩水中に濃度50ppmとなるよう分散し、ラット尾静脈より2回/日で3日間投与した後、屠殺し各臓器を摘出した。各臓器は乾燥後にB培培内で800℃×2時間加熱して灰化した後、5N硫酸で溶解、25mlに希釈した後、ICP（日立：P-4010）にてCe量を定量し、臓器へのナノカプセルの集積状態を調査した。

### 3. 結果

#### 【CNT含有複合材料の特性】

図2にTi/CNT複合材断面のSEM像を示す。Ti粉末のみをSPSにて焼結した場合は若干の気孔が見られるが概ね緻密に焼結されていることがわかる。CNT含有量が5%の場合でも断面像に大きな変化は見られないが、CNT含有量が10%以上では内部に多くの気孔が見られ、粗造になっていることがわかる。

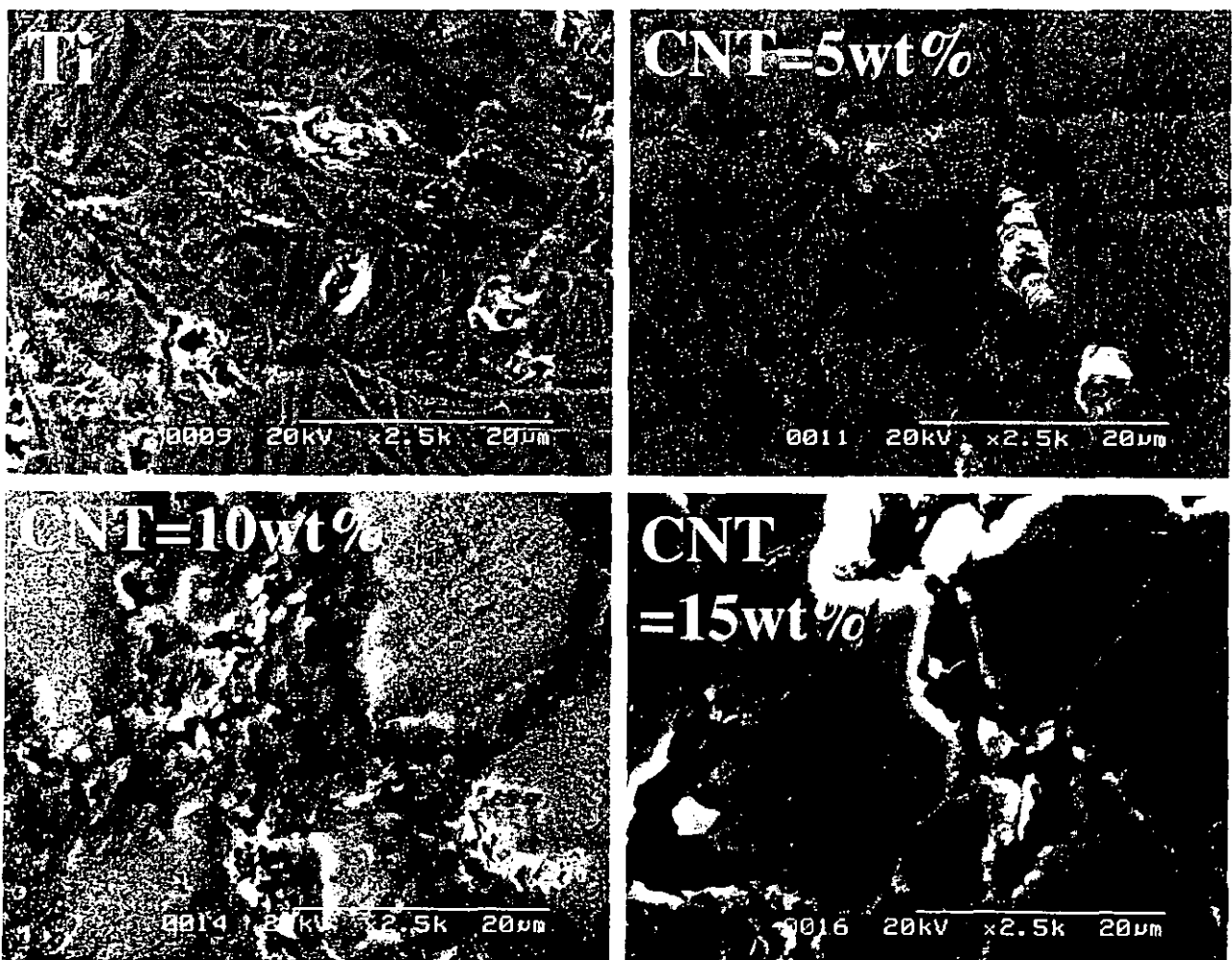


図2 SPSにて焼結したTi/CNT複合材断面のSEM像

焼結体の密度はTiのみで4.19g/cc, Ti-10%CNTで4.20g/ccであり、大きな差は見られなかった。Tiのみを焼結した場合でも、Ti本来の密度(4.51)に比べて低くなっており、これは図2に見られるような気孔に起因するものと推測された。

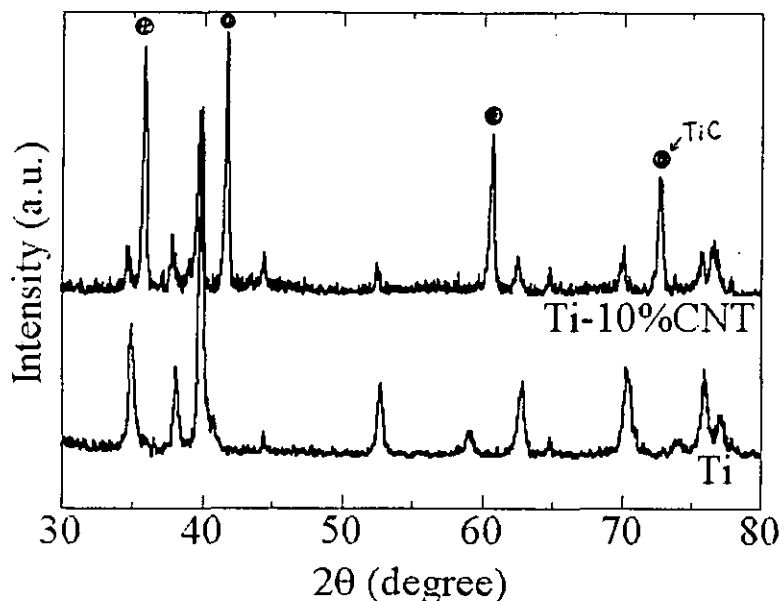


図3 Ti/CNT複合材のX線回析結果

図3はX線回析スペクトルを示しており、CNT10%含有複合材ではTiのピーク以外に炭化物であるTiCのピークが明瞭に観察され、CNTに由来するピーク( $2\theta = 26^\circ$ 付近)は観察されず、CNTの大部分がチタンの炭化に消費されていると考えられた。

本実験ではSPSによる焼結性の向上を考慮して水素化チタンを使用した。水素化物使用による還元性雰囲気により、炭化が進行しやすくなった可能性があるため、今後材料の検討を要する。

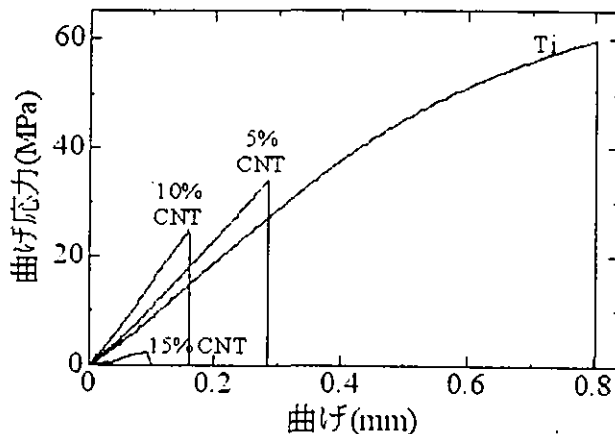
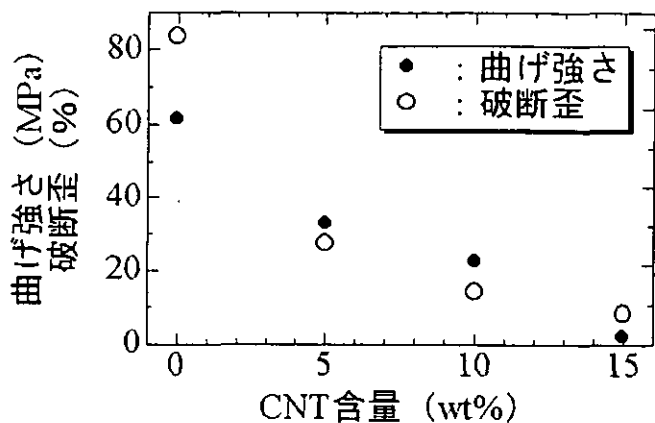


図4 Ti-CNT複合材の3点曲げ試験結果 図5 Ti/CNT複合材の曲げ試験結果の例

図4, 5はTi/CNT複合材の3点曲げ試験結果を示す。CNT含有量の増加とともに、曲げ強さ、破断歪ともに低下している。この原因としては上述の通りCNTがTiと反応して炭化物を形成したため、図2に示した通り気孔率の高い構造となったことに起因すると推測される。

以上より水素化チタン粉末を用いたTi/CNT複合材ではTiがCNTにより炭化して特性が著しく低下するため、通常チタン粉末を用いる、SPS焼結条件をさらに低温にするなどの検討を今後行う必要がある。

## 【ナノカプセルの生体内挙動の評価】

Ce-CNCを投与したラットの各臓器内のCe濃度を表2に示す。表中Controlは坩堝のみで灰化・溶解を行った場合のバックグラウンドのCe濃度を示す。また本ICP装置におけるCeの検出限界は0.02~0.03ppm程度と考えられる。表中の○、△、×はバックグラウンドと比較してCe濃度の信頼性を示しており、○はほぼ信頼に足る、×はバックグラウンドと大差ない。

この結果から一部の臓器（肺、心臓、腎臓）には、ややCeの存在が認められるが最も多く存在するのは血液中であることがわかる。

表2 Ce-CNC投与ラット各臓器内のCe濃度

臓器名	臓器重量 (g:wet)	25ml溶解後濃度 (ppm)	臓器内濃度 (ppm)
脳	0.35	0.038	0.20 ×
脾臓	0.80	0.039	0.13 ×
肺	2.50	0.060	0.24 △
心臓	1.36	0.060	0.46 △
肝臓	20.16	0.042	0.01 ×
腎臓	3.27	0.057	0.17 △
血液	4.40	0.137	0.58 ○
Control	—	0.035	—

またここで検出された全Ce量は約5 $\mu$ gと推定され、投与したCe-CNCが300 $\mu$ g (50ppmCe-CNC 1ml $\times$ 6回)であり、その重量の大部分がCeであることを考えると、検出されたのはごく一部である。他の代謝・蓄積としては血管内皮の食食や尿への放出が考えられるため、今後さらに検討する必要がある。

## 4. 今後の方針

### ・CNT含有複合材料について

原料粉末及び焼結条件を検討し、焼結後にCNTが残留し、繊維強化が期待できる条件を検討する。

また樹脂/CNT複合材をSPSで作成することを検討する。

### ・ナノカプセルについて

ナノカプセルの細胞への取り込まれ方を調査するため、ラット皮下にCe-CNT懸濁液を注入し、その組織標本をX線分析顕微鏡や光学顕微鏡、TEM等で観察する。

またCeは灰化してCeO<sub>2</sub>となった際に化学的に安定で溶解が困難であるため、他の希土類含有ナノカプセルの使用も検討する。特に蛍光性の良好な希土類 (Gd) を内包させることにより、新たな機能を付与し得ることを期待している。

# EXAFSによる合金ナノクラスターの内部構造解析

北海道大学触媒化学研究センター

○朝倉清高

## 1. 序

EXAFS分光法は、ナノ超微粒子構造解析手法として、広く使われている。とくに、2元系合金ナノクラスターでは、それぞれの吸収端より構造解析を行うことができるため、他の手法では得られないような合金ナノクラスターの内部構造を知ることができる。これまで、合金ナノ粒子の内部構造として、一方の成分が表面に出るcore-shell構造、二つの元素がランダムに混じり合うランダム合金構造が提案され、その2種類に分類されることが多かった。EXAFSを詳細に解析すると、それ以外にも同種成分どうしが集まり、ミクロクラスターを構成し、さらにそれが集まってナノクラスターを作るcluster-in-cluster構造や異種金属どうしがよりあつまるheterobondphilic構造などが存在することが示される。本稿では、こうした新しい合金ナノクラスターに関して報告する。

## 2 Cluster-in-Cluster構造 PtPdナノクラスター

PtとPdの塩を混ぜて、還元するとPtPdのナノクラスターを得ることができる。一般には、PtとPdの合金微粒子では、昇華熱の大きなPtがcore、Pdがshellになるcore-shell構造を作ることが知られている。

EXAFSからPtやPd周りのPtやPdそれぞれの配位数をもとめることができる。その結果を表1に示す。特定成分の全配位数が小さいというCore-shell構造の特徴も見ることができない。また、どの組成においても同種の配位数が異種間の配位数より大きい。これらの配位数における特徴は、同一成分がまず寄り集まり、さらに大きなクラスターを作るcluster-in-cluster構造により説明することができる。<sup>1</sup>こうしたcluster-in-cluster構造を作る要因として、PdとPtの還元反応の早さや熱力学的な還元されやすさの差が上げられる。すなわち、PdはPtより還元反応が早く進行し、最初にPdが還元される。Pdのナノクラスターができるとそれが触媒になり、Ptが還元されはじめるが、Ptと一緒にPdが還元されると、熱力学的に安定なPtイオンによりPdは再びイオン化されるとため、両者の合金はできにくいものと解釈される。

## 3. heterobondphilic 構造CuPdナノクラスター

一方CuとPdのナノクラスターでは、全く反対の傾向が観測される。すなわち、異種結合の配位数が同種結合の配位数よりも大きい。これは、CuとPdが強い結合をつくるため、異種結合が優先的に生成する合金ナノクラスターができたためであると考えられる。<sup>2</sup>