

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。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. 3)、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。このことは、MWCNT表面の糖鎖を変えた場合にも観察され (Fig. 4)、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。

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されることが示された。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。これらのことは、DDSのような細胞選択的な認識を必要とする研究のためには、ポリスチレン型糖鎖修飾MWCNTが有用であると考えられる。

*以下、模式図にて実験結果をまとめて説明する。

(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繁に利用されるビオチン-アビジ

ンの選択的な認識をMWCNTへ導入できないか検討を行った。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するので、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いえる。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を修飾すればよい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

上記より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。 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。一概にはいえないが、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た。

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。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、今回は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。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いことが分かった。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。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。それにより、糖鎖結合型アルブミンの糖鎖をレクチンが選択的に結合したと推測される。

4. 結論

MWCNT表面を修飾する場合の糖鎖化合物構造による認識の違いを検討した。その結果、糖鎖を選択的に認識させるのに便利なのはポリスチレン型人工糖質高分子であった。一方、ポリアクリルアミド型人工糖質高分子、糖質界面活性剤、糖鎖結合型アルブミンでは、単にMWCNTを処理したものでは選択的認識を示さなかった（原因：弱い吸着力のため洗浄中にMWCNT表面より部分的に脱落するのでは）。アルブミン共存下では、糖鎖結合型アルブミンで修飾したMWCNTも選択的な認識を示した。以上の結果より、糖鎖化合物の種類やアルブミン共存下などの使用条件が、MWCNT表面上で選択的認識を行うために重要であることが明らかとなった。

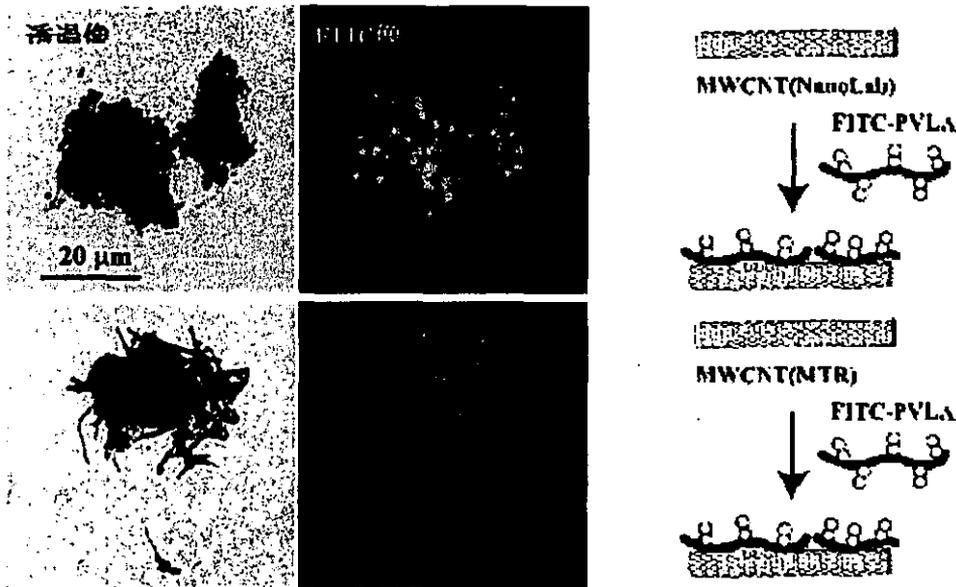
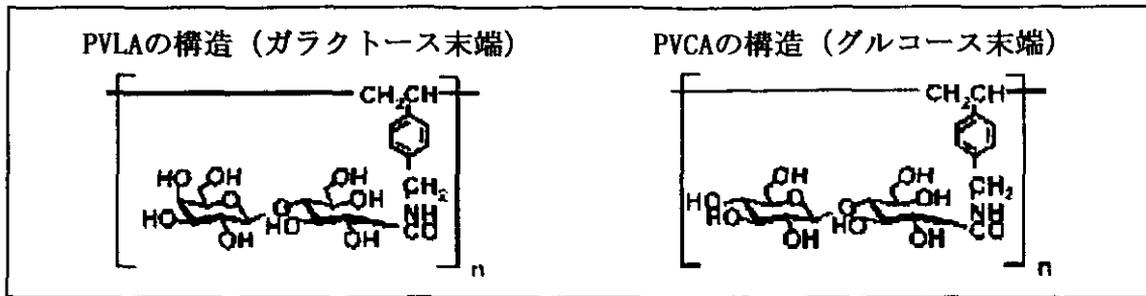


Fig.1 MWCNT/FITC-PVLAの蛍光CLSMイメージ (上段: NanoLab、下段: MTR)

上段のMWCNT (NanoLab)の場合、顕微鏡ではチューブの形は観察されないが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。

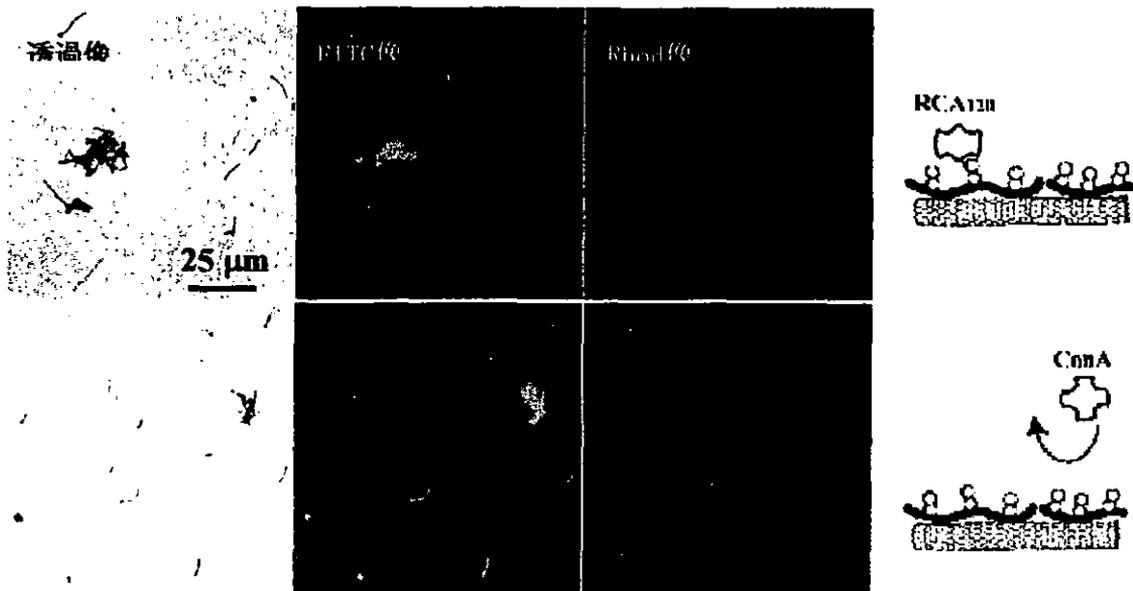


Fig.2 Rhod-RCA120(上段)、Rhod-ConA(下段)とMWCNT/FITC-PVLAの相互作用後の蛍光CLSMイメージ

MWCNT表面の糖鎖 (β -Gal)は、相当するRCA120レクチン(β -Gal特異的)と結合し、特異性が異なるConAレクチン (α -Manまたは α -Glc特異的)とは結合しない。

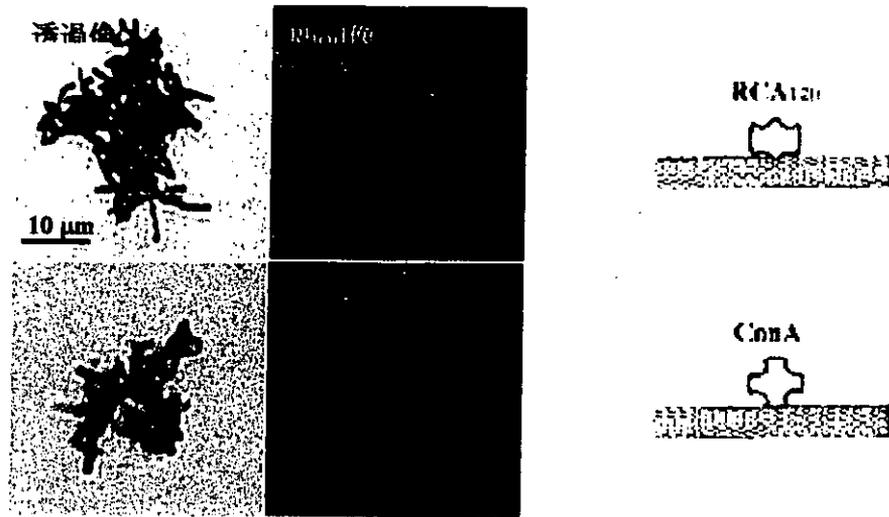


Fig. 3 はだかのMWCNT (MTR) とレクチンの相互作用後の蛍光CLSMイメージ (上段 : MWCNT vs RCA120、下段 : MWCNT vs Rhod-ConA) MWCNTへの両レクチンの非特異吸着が観察された。

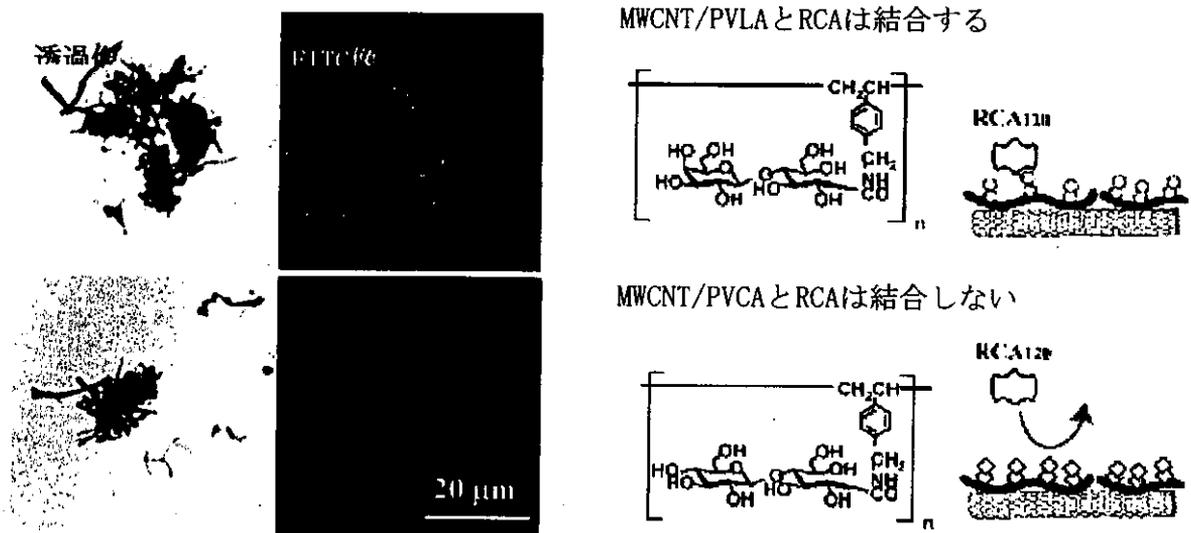
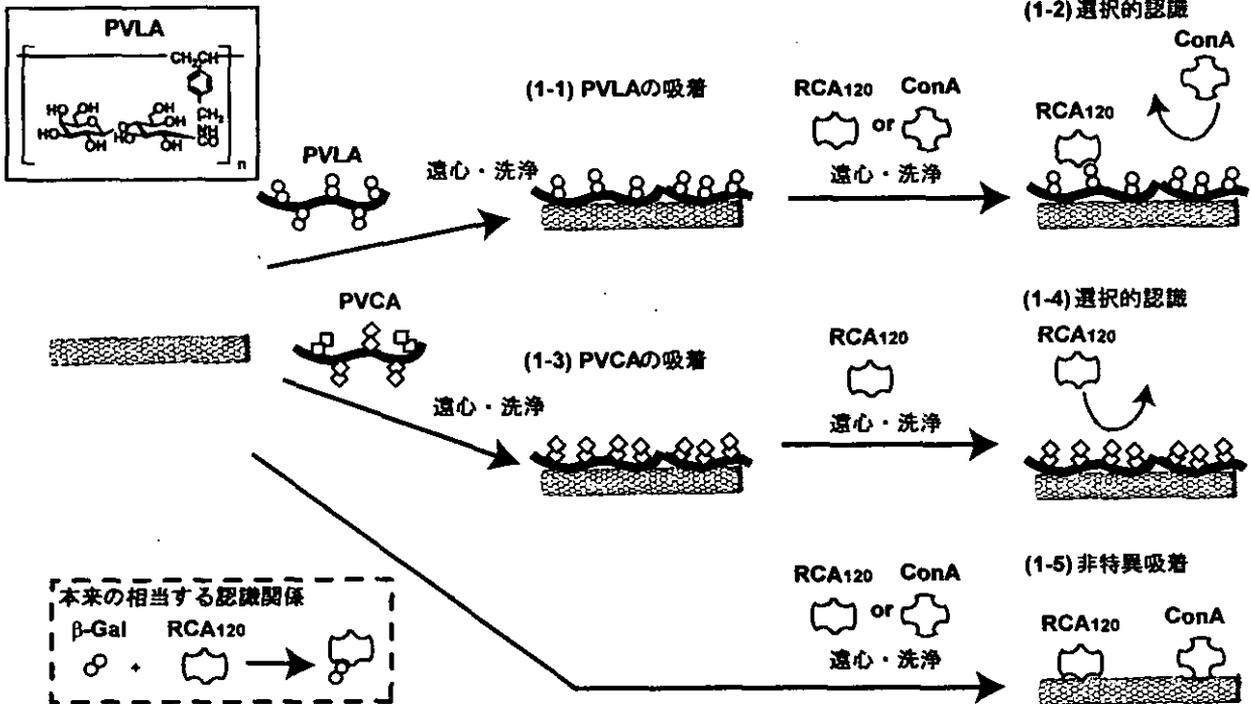


Fig. 4 PVLAまたはPVCAで修飾したMWCNT (MTR) とレクチンの相互作用後の蛍光CLSMイメージ (上段 : MWCNT/PVLA vs FITC-RCA120、下段 : MWCNT/PVCA vs FITC-RCA120)

糖鎖構造の違いによりレクチンの選択的認識が観察された。

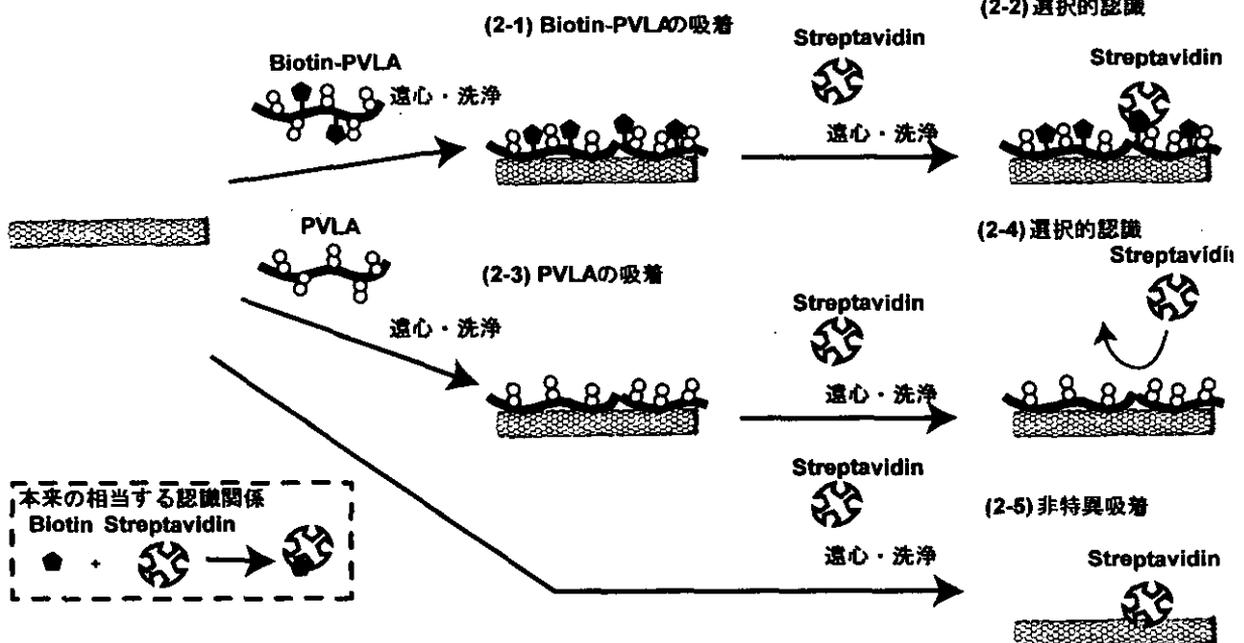
ポリスチレン型人工糖質高分子によるMWCNTの修飾

(図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



以上の結果より、ポリスチレン型人工糖質高分子（ガラクトース側鎖：PVLAおよびグルコース側鎖：PVCA）はMWCNT表面に吸着し、洗浄してもはがれない。また吸着した糖鎖はレクチンの種類により選択的に認識され、糖鎖機能は保持されている。ポリスチレン型人工糖質高分子では非特異的吸着を抑えられることより、糖鎖（または高分子がMWCNT表面に密に存在している。(*糖鎖の選択的認識を必要とする研究目的に適している)

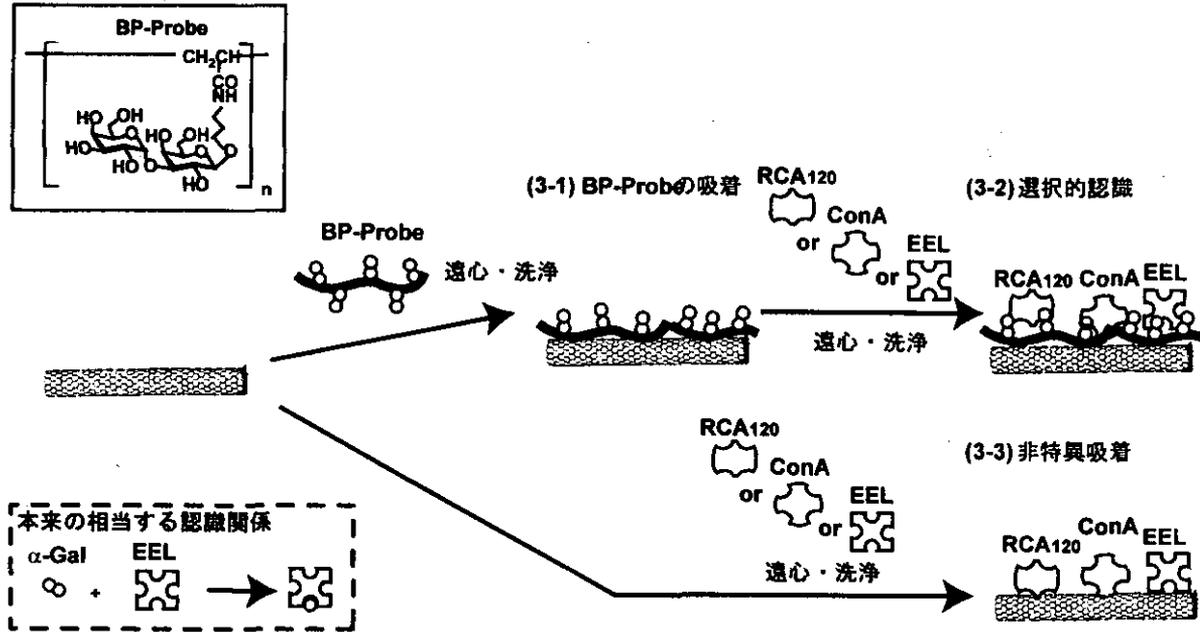
(図2) ビオチンラベル化 ポリスチレン型人工複合糖質高分子とアビジンの相互作用



以上の結果より、ビオチンラベル化 ポリスチレン型人工糖質高分子（ガラクトース側鎖とビオチンの両方をリガンドとして持つ：Biotin-PVLA）はMWCNT表面に吸着し、洗浄してもはがれない。ビオチンはストレプトアビジンにより選択的に認識される。またこの際の糖鎖は、ストレプトアビジンの非特異的吸着を抑えるブロッキング剤として働いている。(*ビオチンの選択的認識を必要とする研究目的に適している)

ポリアクリルアミド型人工糖質高分子によるMWCNTの修飾

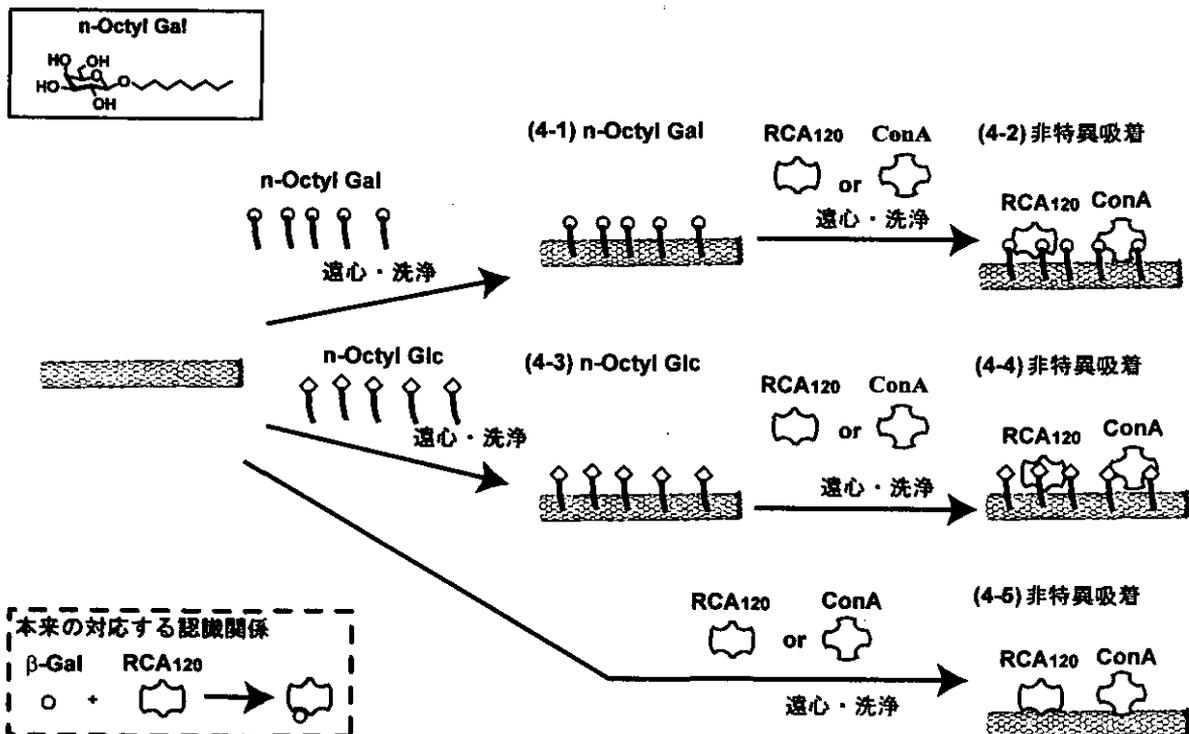
(図3) ポリアクリルアミド型人工糖質高分子とレクチンの相互作用



以上の結果より、ポリアクリルアミド型人工糖質高分子はポリスチレン型人工糖質高分子とは異なり、レクチン認識に対する選択性が発現しない。

糖質系界面活性剤によるMWCNTの修飾

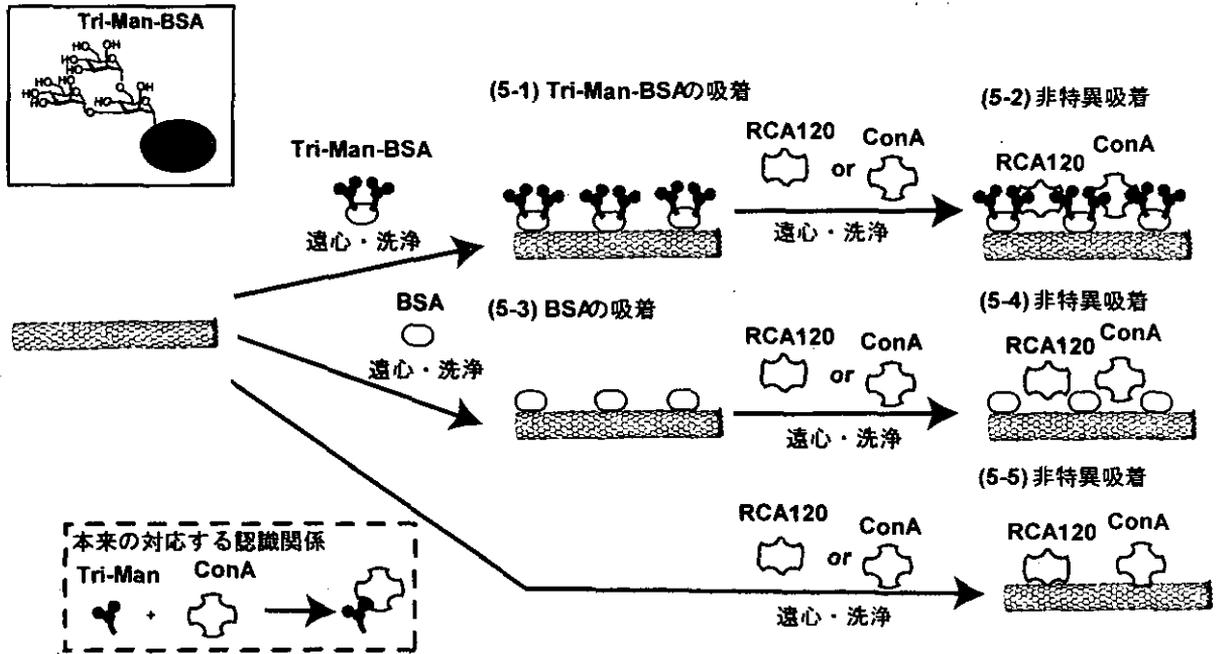
(図4) 糖質系界面活性剤とレクチンの相互作用



以上の結果より、糖質系界面活性剤はレクチン認識に対する選択性が発現しない。

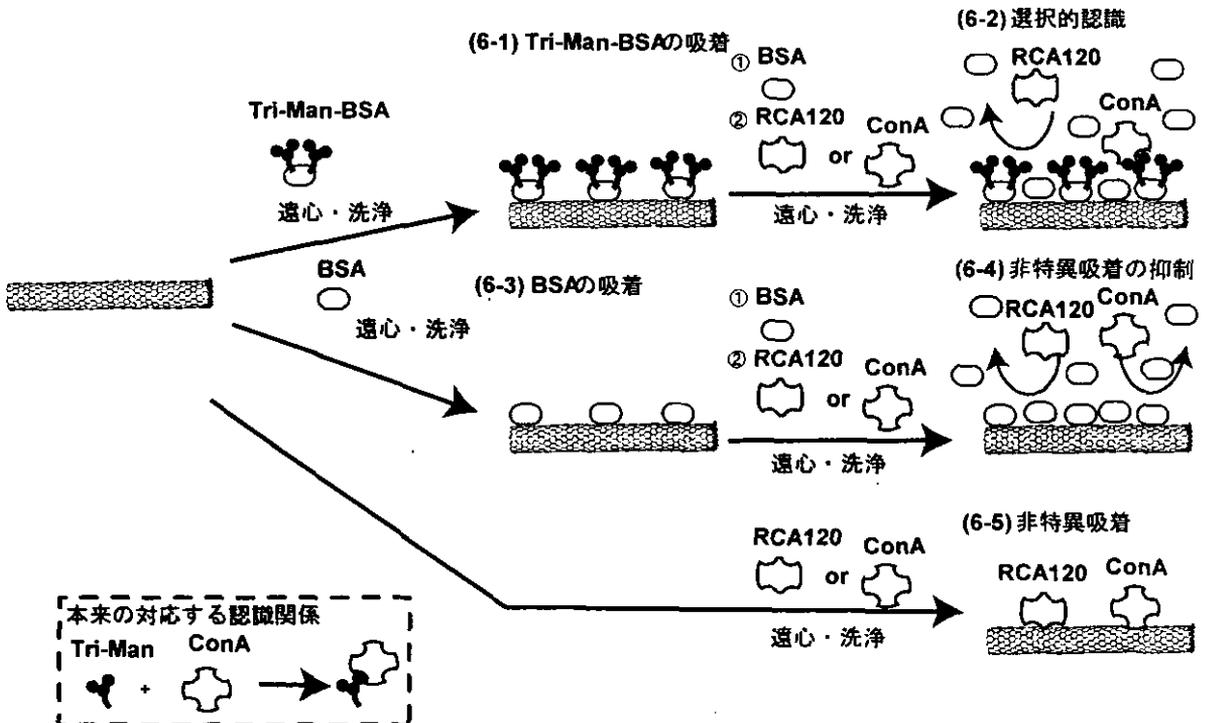
糖鎖結合型アルブミン（またはアルブミン）による MWCNTの修飾

(図5) 糖鎖結合型アルブミンとレクチンの相互作用



以上の結果より、BSA骨格型人工糖質高分子（マンノース側鎖：Tri-Man-BSA）でMWCNTを処理した場合、レクチンの選択的な結合は観察されず、非特異的であった。また、BSA（一般に非特異吸着を抑制する）で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。これらのことは、吸着する物質の構成成分により吸着状態が異なり、その後の認識がうまくいかない場合があることを示している。洗浄の際にBSAが一部MWCNT表面より剥がれ落ちるため、露出された表面に対しての非特異吸着が起きる。

(図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



以上の結果より、BSA骨格型人工糖質高分子（マンノース側鎖：Tri-Man-BSA）でMWCNTを処理すると、一部が表面より剥がれ落ちる。しかし、露出された表面をブロックするために BSAを共存させた状態でレクチンとの結合試験を行うと、選択的な認識を発現させることができる。（* BSA骨格型人工糖質高分子は、糖鎖の選択的な認識を必要とする場合適しているが、BSA等のブロッキング剤を必要とする。）

Nanocrystalline calcium phosphates as bone substitution materials and for cell transfection

Prof. Matthias Epple

Institute of Inorganic Chemistry, University of Duisburg-Essen,
Campus Essen, Germany

Calcium phosphates are the inorganic constituent of human hard tissue, i.e. of teeth and bone. Except for the outer layer of teeth ("enamel"), they are present as nanocrystals within an organic matrix of collagen. Structurally, biological apatites are hydroxyapatites that contain substitutions of other ions, mainly of carbonate.^[1]

For bone substitution, it is important to have a biocompatible and biodegradable material. Calcium phosphates have an excellent biocompatibility and show a good on- and ingrowth of bone cells. However, their biodegradability is sometimes slow, especially if calcined phases of high crystallinity are used (like sintered bovine bone). This can be ascribed to a lower solubility of crystalline, stoichiometric hydroxyapatite in comparison to a nanocrystalline, defect-containing precipitated apatite. Because the resorption occurs by osteoclasts which form an acidic microenvironment, the solubility in acids is of crucial importance.

We have developed a continuous precipitation method which can be used to prepare nanocrystalline calcium phosphates with a carbonate content comparable to bone mineral. Chemically and crystalligraphically, the synthetic material is almost identical to the natural biomineral. By cold-isostatic pressing and subsequent machining, it is possible to prepare mechanically stable objects that can be used as biodegradable bone substitution material.^[2-4]

As an extension, calcium phosphate nanoparticles were functionalised by DNA to form a stable colloidal dispersion. This can be used for the transfection of cells, i.e. the non-viral transfer of DNA into the cell nucleus.

- [1] S. V. Dorozhkin, M. Epple, Biological and medical significance of calcium phosphates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41 (2002) 3130-3146.
- [2] D. Tadic, F. Peters, M. Epple, Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites, *Biomaterials* 23 (2002) 2553 -2559.
- [3] D. Tadic, M. Epple, Mechanically stable implants of synthetic bone mineral by cold isostatic pressing, *Biomaterials* 24 (2003) 4565-4571.
- [4] D. Tadic, M. Epple, A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone, *Biomaterials* 25 (2004) 987-994.

Use of Alginate as the Solubilizing Agent for Preparation of Water-Soluble Carbon Nanotubes/Nanofibers

古月文志¹, 野田坂 佳伸², 柴 肇一³, 進藤正信⁴, 巨理文夫⁵

¹Lab. of Biofunctional Chemistry, ²Lab. of Electron Microscopy, ⁴Lab. of Oral Pathology, and ⁴Lab. of Functional Biomaterials, Graduate School of Dentistry, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan; ³Frontier Research Div., FUJIREBIO Inc., 51 Komiya, Hachioji, Tokyo 192-0031, JAPAN

アルギン酸を可溶化剤として用い、水溶性カーボンナノチューブ及びカーボンナノファイバーを作製した。TEM, SEM, zeta-potential 測定, 及びラットの経口投与実験を行い、物性・毒性などについて検討した。その結果を報告する。

Production of water-soluble carbon nanostructures (carbon nanotubes, CNTs, and carbon nanofibers, CNFs) 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 wrapping³⁻⁷, are the methods, being used frequently, for production of the water-soluble carbon nanostructures. The products obtained with these methods, however, may not be as biocompatible as would be desirable.

Here we present a new yet highly effective approach to production of the water-soluble carbon nanostructures by using alginate as the solubilizing 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 solubilization approach based on alginate provides advantages over the previous methods 1) that a large amount, full-length, pristine form of the water-soluble carbon nanotubes/nanofibres can be produced in a single step, and in a very simple manipulation procedure, 2) that the resultant products are highly desirable for clinical, medical, and the other biotechnologically relevant operations, and 3) that the aqueous alginate/carbon-nanostructure complexes can be rearranged in to films, fibres, beads, at will.

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). Single-walled type of the carbon nanostructures (SWCNT, length: 2-5 µm) and the multi-walled carbon nanostructures (MWCNT, length: 5-20 µm, diameter: 10 – 40 nm) were obtained from NanoLab (Brighton, MA) and MTR Co., Ltd. (Ohio), respectively. Herringbone-structure carbon nanofibers (length: 2-10 µm, diameter: 50 – 300 nm) was the gift and was kindly donated by Tohoku University (Sendai, Japan). The carbon nanostructures were firstly dispersed in aqueous alginate solutions by using a high-shear mixer. The aqueous alginate solutions contained sodium alginate in a concentration range 0.1 mg/ml to 40 mg/ml. These alginate/carbon-nanostructure mixtures were then incubated at 40 °C for several days and black uniformed dispersions were obtained. Forty millilitres of a dispersion containing 0.25

mg/ml of MWCNT and 20 mg/ml of sodium alginate was centrifuged at 4000 rpm for 30 min and black residues being separated from the aqueous phase was observed. After repeating the cycle of dispersion/centrifugation on the residue, the amount of amorphous carbon removed was found to be 3.2 mg. The very dilute alginate/MWCNT aqueous solution is visually transparent, and no precipitation was observed up prolonged standing at room temperature.

Firstly, we used transmission electron microscope (TEM, Hitachi H-800) to observe the water-soluble carbon nanostructures involved in the aqueous alginate solutions. Fig. 1 shows a typical TEM image, in which, twisted and wiggled MWCNTs were clearly observed. Similar results were also observed for the alginate/SWCNT, alginate/CNF aqueous solutions.

Next, we used FTIR and zeta potential analysis for study of the interactions occurring between the carbon nanostructures and alginate. A hundred millilitre of an aqueous alginate/MWCNT solution (30 ng/ml of MWCNT; 0.3 mg/ml sodium alginate) was filtrated by passing them through two stacked polycarbonate filters of 1 µm pore size using a high-pressure vesicle extruder to remove the excess of sodium alginate. The isolated MWCNT (black colloids) were dried at 50 °C and were then analysed using FTIR in the solid state using the potassium bromide (KBr) pellet method. Diagnostic bands of alginate centring at 3415, 1625, 1430 and 1250 cm⁻¹ were observed.⁹

MWCNT with the excess of sodium alginate being removed were redispersed in deionized water and were then analysed for measuring their zeta potential by using an electrophoretic light scattering spectrophotometer (ELS-8000, Otsuka Electronics). The 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 represent the electrophoretic mobility, viscosity, and the dielectric constant of the liquid in the boundary layer, respectively). The average value of three measurements of the zeta potential for the alginate-modified MWCNT is found to be -66.94 ± 0.35 mV, indicating the alginate-modified MWCNT are highly negatively charged.

The same electrophoretic light scattering spectrophotometer was also used for assigning the length of the alginate-modified MWCNT based on the Einstein-Stokes equation. The average value of three measurements was found to be 12224.2 ± 717.00 nm.

It is evident that the carbon nanostructures are highly negatively charged and containing alginate, suggesting complexes of alginate/carbon-nanostructure are formed by physically associating the carbon-nanostructures with alginate. The alginate molecules establish a highly hydrophilic terminal domain of the alginate/carbon-nanostructure complexes; this results in bringing solubility to the carbon nanostructures toward the aqueous solutions. Figure 2 shows SEM images of the freeze-ried alginate/MWCNT complexes.

The water-soluble carbon nanostructures prepared using alginate as the solubilizing agent can be processed further in to films, fibres and beads, by using calcium ions or the other divalent or trivalent cations as the coupling ions. Figure 2 shows the typically film and fibre products obtained by using Ca^{2+} as the coupling ions. Study on the potential applications of the alginate/carbon-nanostructure complexes to medical, food, and the other biologically relevant field is underway and the data will be reported in subsequent publications.

References and Notes

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. Obratsova, 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. Bandyopadhyaya, 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. P. Chandia, B. Matsuhito, A. E. Vasquez, *Carbohydrate Polymers*, 46, 81 (2001).

Acknowledgment

We thank Prof. Kazuyuki Tohji of Tohoku University for dominating the highly purified HB-CNFs. This study was partly supported by Grant-in-Aid for Research on Nano-medicine #H14-nano-021 from the Ministry of Health, Labor and Welfar.



Figure 1. TEM image of an aqueous alginate/MWCNT solution sample. The TEM grid was immersed in the aqueous alginate/MWCNT solution for few second and was then air-dried. TEM (Hitachi H-800) operated at 200 kV was used. Scale bar, 15.54 nm.

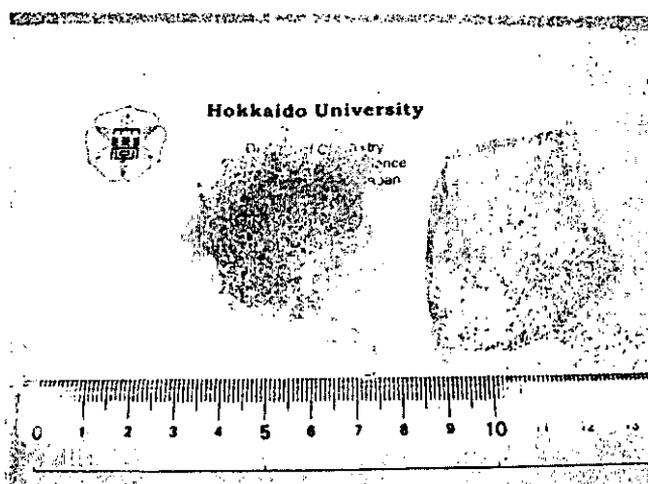


Figure 2 Photos of the alginate/MWCNT composite film (right-one) and fibre (left-one) prepared using Ca^{2+} ions as the coupling ions.

水溶性カーボンナノチューブの細胞毒性と酸素ラジカル消去に対する効果に関して

富士レビオ株式会社

○柴 肇一

北海道大学大学院理学研究科

古月 文志

北海道大学大学院歯学研究科

野田坂 佳伸・横山 敦郎・進藤 正信・亘理 文夫

アルギン酸を用いて可溶化したカーボンナノチューブにおいて、その細胞毒性を評価する目的で、歯周繊維芽細胞（HGF）を用いて各種濃度における細胞増殖における影響を、MTS法を用いて調べた。その結果、HGFに対する増殖の阻害や生存率の減少はいっさい見られず、*in vitro*における細胞毒性はほとんどないことが再確認された。また、可溶化カーボンナノチューブの酸素ラジカル消去効果に関して、Pholasinの発光に対する発光抑制量を評価することにより測定した。その結果、顕著なラジカル消去作用は確認されなかった。可溶化カーボンナノチューブの生体内での反応性は低いと考えられるが、何らかの生理機能向上に寄与する効果を見出すことができれば、今後医療分野での応用にも結びつく可能性もある。今後も新しい機能を探索する予定である。

水溶性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ならびに転写因子 NF- κ B を活性化するのか

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

柴田 健一郎¹⁾、藤田真理¹⁾、黒岩理暢¹⁾、佐藤義倫³⁾、田路 和幸³⁾、古月文志⁴⁾、
亘理文夫²⁾

<研究目的>

我々はこれまでに、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- α 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。しかしながら、これらのカーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブを溶解・浮遊している溶媒に活性がある可能性が考えられるために、本研究では溶媒の影響について検討した。さらに、低分子化し、可溶性に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のマクロファージならびに転写因子 NF- κ B を活性化能についても検討した。

<材料と方法>

1. 古月等の方法で調整したサンプル

カーボンナノロッド、カーボンナノチューブ、溶媒

2. 佐藤義倫³⁾、田路 和幸調製サンプル

CNF: acid cut CNF 031003

NL2: acid cut NL2 MW 031003

ENL2: ET,ozon cut NL2 MW 031003

3. 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マクロファージ(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 μ l中に 5×10^5 個のTHP-1細胞を懸濁させ、原液、10倍希釈液、100倍希釈液の10 μ lで16時間刺激した。遠心により上清を集め、ELISA法でTNF- α 量を測定した。

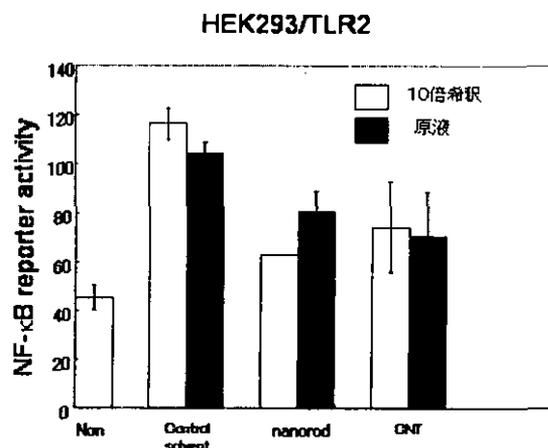
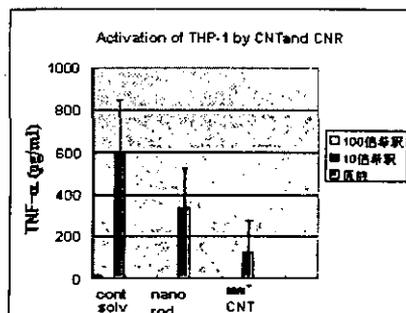
4. カーボンナノロッドのTLR2による認識

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- κ B依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子(pNF- κ B luciferase reporter plasmid)とともにhuman embryonic kidney (HEK) 293細胞に遺伝子導入し、原液ならびに10倍希釈液の10 μ lで6時間刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

<結果ならびに考察>

1. 古月サンプルのマクロファージならびにTLR2を介した転写因子NF- κ Bの活性化

古月等の方法で調製したサンプルは浮遊・溶解させた溶媒が最も強い活性化能を有し、希釈に従い、その活性化能は減少した(右図)。このことから、これらのサンプルのマクロファージならびにTLR2を介した転写因子NF- κ Bの活性化能は溶媒中に存在する何らかの因子の作用であると考えられる。

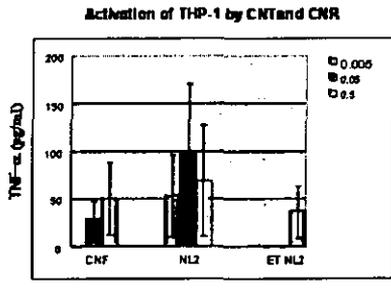


風月先生調製CNT、CNRならびにその溶媒

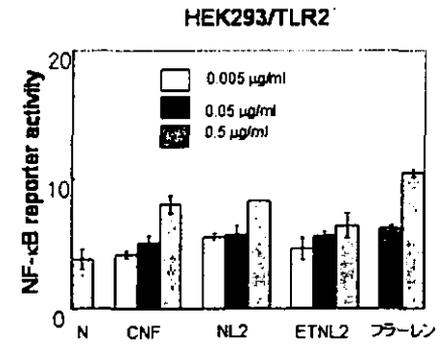
2. 田路・佐藤サンプルのマクロファージならびに TLR2 を介した転写因子 NF- κ B の活性化

CNF、NL2 ならびに ENL2 はすべて、マクロファージの活性化能を有しているが、その活性は非常に弱いことがわかった(左図)。さらに、これらは TLR2 を介した転写因子 NF- κ B の活性化能も有し、また濃度依存性がみられたが、その活性は非常に弱いことがわかった(左図)。

以上の結果から、カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブの生体に対する毒性は非常に弱いものと推測される。ただし、カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブを生体に応用する場合には、これらに生体高分子などが結合することにより、自己の生体高分子に構造変化が生じ、異物として認識され、毒性が高まる可能性は否定できないものと推測される。



CNF: acid cut CNF 031003
 NL2: acid cut NL2 MW 031003
 ENL2: ET,ozon cut NL2 MW 031003



カーボンナノチューブの生体材料への応用 -*in vivo* での CNT 固化体に対する反応-

○ 横山敦郎, 山本悟, 王蔚, 青木尚史, 佐々木紘子, 川崎貴生, 野田坂佳伸,
向後隆男, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理文夫
北海道大学大学院歯学研究科
佐藤義倫, 田路和幸
東北大学大学院環境科学研究科
大森守
東北大学金属材料研究所

1. 緒言

平成 14 年度の第二回研究成果発表会において, 我々はカーボンナノチューブを Spark Plasma Sintering (SPS) 法を用いて固化した試料について動物埋入実験を行い, 結合材である phenol resin が生体適合性に影響する可能性があることを報告した. 今回は, 結合材の影響を明確にするため, 結合材を含まない固化体, phenol resin および新しい結合材として polycarbosilane を用いた固化体を作製し, 生体適合性を検索した.

2. 材料および方法

1) 材料

(1) 結合材を含まない固化体および phenol resin を結合材として用いた固化体 (東北大田路研佐藤先生より供与)

直径 20-50nm, 長さ 5 μ m 以下の MWCNTs に重量比で, 0% (NBM), 25% (25PR), 50 % (50PR) の phenol resin を混合し, 焼結圧 80MPa, 焼結温度 1000 $^{\circ}$ C の条件で SPS 装置にて焼結し, 1 \times 1 \times 5mm に調整した.

(2) polycarbosilane を結合材として用いた固化体 (東北大金研大森先生より供与)

MWCNTs (NanoLab 社製) に重量比で, 5% (5PCS), 15% (15PCS), 25% (25PCS) の polycarbosilane を混合し, 焼結圧 120MPa, 焼結温度 1200 $^{\circ}$ C の条件で SPS 装置にて焼結した.

2) 方法

8 週齢 Wistar 系雄性ラットを実験動物として用い、全身麻酔下で腹部皮下組織にポケットを形成し、材料を埋入した。結合材を含まない固化体および phenol resin を結合材として用いた固化体については埋入後 1 週で、polycarbosilane を結合材として用いた固化体については埋入 2 週後で周囲組織とともに摘出し、ホルマリンにて固定後材料を可及的に丁寧に除去後、通法に従いパラフィン包埋を行い、HE 染色を施し組織学的に検索した。尚、polycarbosilane に対する反応を検索するため、polycarbosilane のみについても同様に埋入し、検索した。

3. 結果

1) 結合材を含まない固化体および phenol resin を結合材として用いた固化体

NBM は、細胞成分の多い比較的密な線維性結合組織に被包されていた。結合組織内には間葉細胞や線維芽細胞が多数観察され、一部の材料表面には、異物巨細胞が認められた (Fig. 1,2)。phenol resin を含む 25PR および 50PR は、NBM に比較するとやや厚い線維性結合組織により被包されていた。結合組織内の細胞および毛細血管は、NBM に比較し多く、50PR 周囲には、リンパ球が観察され、PR の含有量が多いほうが、材料周囲の炎症反応は強い傾向を示した (Fig. 3,4)。NBM, 25PR および 50PR のいずれの場合においても、材料を被包する結合組織内に材料の細片を貪食するマクロファージが観察された。

2) polycarbosilane を結合材として用いた固化体について

PCS のみの埋入においては、PCS がある程度の大きさの場合は、疎性な線維性結合組織に被包されていたが、細片の場合には、間葉細胞、線維芽細胞および毛細血管を多数含む比較的密な肉芽組織に覆われ、PCS 表面には多数の異物巨細胞が観察された。壊死や好中球の浸潤などの強い炎症反応は観察されなかった (Fig. 5, 6)。CNT の結合材として PCS を用いた場合、PR と同様に、PCS の濃度が高くなると周囲組織の炎症は強くなる傾向を示したが、PR を用いた場合と比較し炎症の程度の差は明瞭ではなかった (Fig. 7-10)。

5PCS, 15PCS および 25PCS のいずれにおいても、周囲の結合組織内に試料の細片を貪食したマクロファージが観察されたが、その数には明瞭な差は認められなかった (Fig. 11-13)。

4. 考察

1) 固化体に対する生体反応について

結合材を含まない NBM において軽微な炎症が認められたが、固化体の表面性状および固化体からの細粉の散逸が推察された。しかし、埋入初期の反応としては軽微であり、十分な生体適合性を有するものと考えられる。

2) 結合材の影響について

上記の結果からも明らかなように、PR、PCS ともに CNTs の結合材として用いて固化体を作製し皮下組織に埋入した場合、含有量に応じて周囲組織に炎症を惹起することが示された。これは、PR のみの埋入実験は行っていないが、PCS のみの埋入結果から、結合材そのものに起炎性があり、CNTs と複合し SPS で焼結した後も固化体表面に結合材、あるいは結合材の反応物が残存し、炎症を惹起することが示唆された。また、PCS のみ埋入した場合と比較し、固化体のほうが炎症は軽微であったことは、CNTs との複合により PCS あるいはその反応物の濃度が低くなったためと推察されるが、CNTs と PCS や PR との密度の差は大きく、結合材の濃度と炎症程度の関係も含めて今後の検討を要するものと考えられる。

3) 結合材の種類について

今回の実験においては、PCS と PR との埋入期間および焼結条件が異なることから、結合材の濃度が同じであっても単純な比較はできないが、埋入 2 週の PCS における炎症の程度は埋入 1 週の PR より軽度なことから、PCS の起炎性は PR と同等か低いことが示唆された。

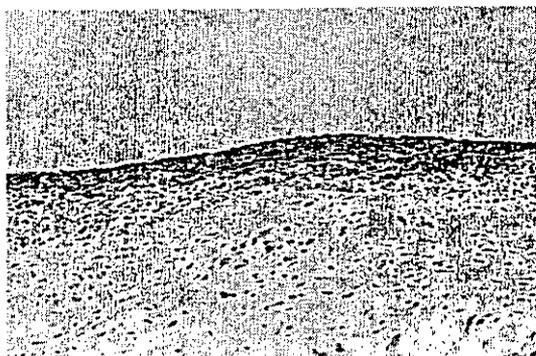


Fig. 1

NBM 埋入 1 週後

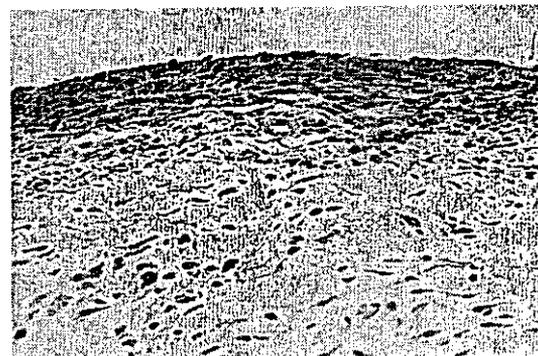


Fig.2

Fig. 1 の拡大像

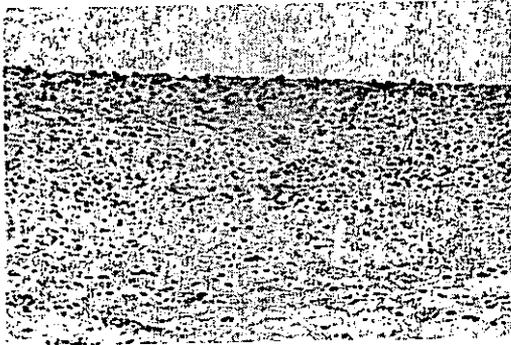


Fig. 3 50PR 埋入 1 週後

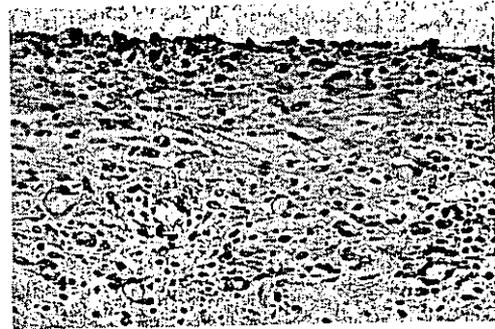


Fig. 4 Fig. 3 の拡大像



Fig. 5 PCS 埋入 2 週後 (細片部)

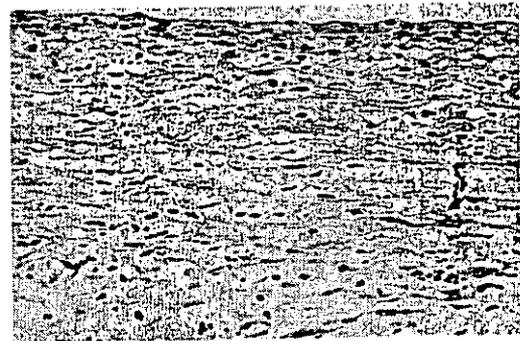


Fig. 6 PCS 埋入 2 週後

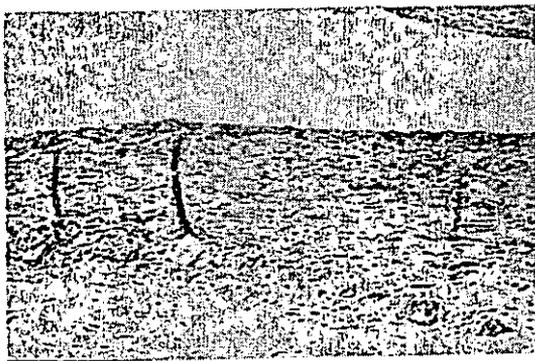


Fig. 7 5PCS 埋入 2 週後

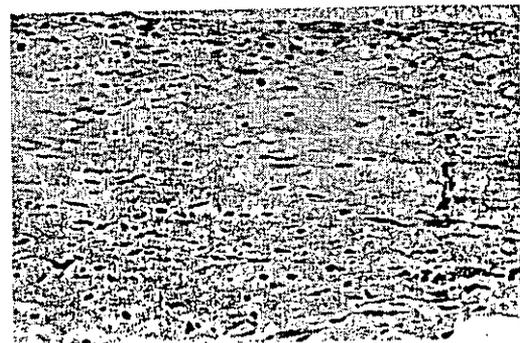


Fig. 8 Fig. 7 の拡大像

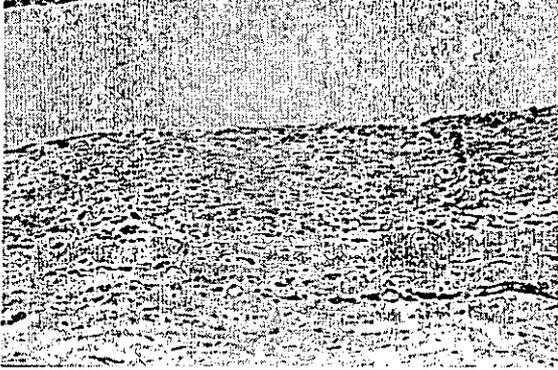


Fig. 9 25PCS 埋入 2 週後

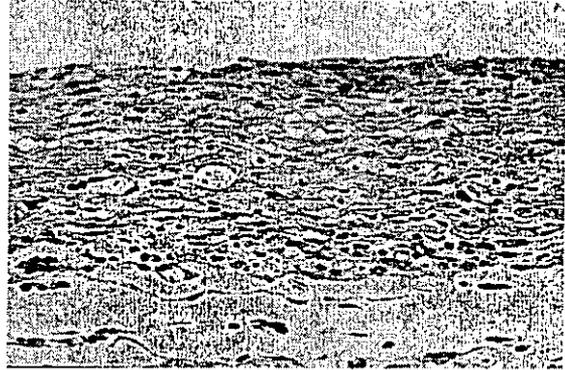


Fig. 10 Fig. 9 の拡大像

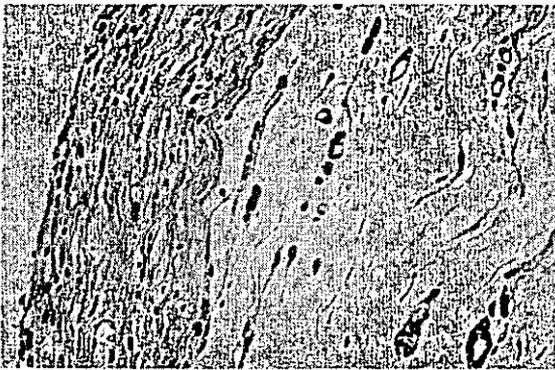


Fig. 11 5PCS 埋入 2 週後

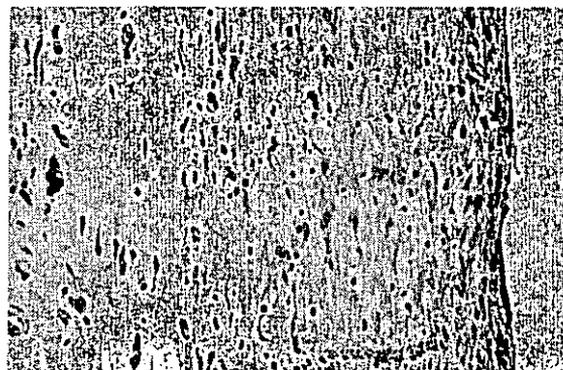


Fig. 12 15PCS 埋入 2 週後

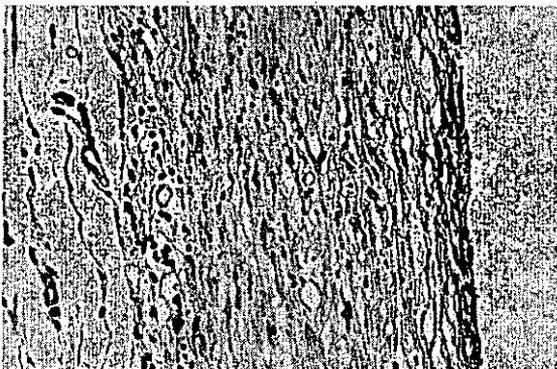


Fig. 13 25PCS 埋入 2 週後

ナノ粒子の健康影響研究の現状と問題点

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔顎顔面外科学分野

大学院3年 田村一央

ナノテクノロジーの発展とともに大気環境中にはナノ粒子が放出されている。しかしながら、その物理学的性状や生体への影響については未解明な部分が多い。ナノレベルの粒子は体内動態や生体の反応が従来までのマイクロレベルの粒子とは異なるのは我々も指摘してきた。近年、こうしたナノレベルの粒子に対する生体への影響が注目されている。2005年の3月に国立環境研内にナノ粒子健康影響実験棟が建つ予定で、また、内閣府総合科学技術会議ではナノテクの人体への影響について調査する委員会を組織する計画もある。ナノテクは、環境を改善するのと反対に、環境を汚染する恐れがある。例えば、モノ作りのために使うナノメートルスケールの微粒子やナノカーボンなどは、環境のみならず人体（体内環境）に悪影響を与える可能性があるのではないかと環境や医療分野の専門家は心配している。私はナノテクの環境や人体への影響について積極的に調べる必要があると考えている。今回は私の行っているナノ粒子やその他微粒子の健康影響研究の現状について報告する。

ナノ粒子はいろいろな場所の大気環境中ですでに検出されている。また、ナノ・マイクロ物質・材料群がこれまでにない新しい機能を持つことから、ナノテクノロジーの発展とともにエレクトロニクス・環境・医療・情報通信・日用品など、様々な分野に応用されている。その結果、ナノ粒子は環境中に放出されたり、接触したりなど、人体に進入する機会が増加する傾向が予想される。ナノ粒子は非常に小さいことから、同質量の場合、表面積が非常に大きいことや、表面に吸着する化学物質の量が増加すること、表面の物性が変わってくることから生体への影響が大きな粒子よりも強い可能性が想像される。また、非常に小さいことから、細胞の中や、細胞間隙を通過しやすくなり血中への移行が可能になる。このことは血流を介して暴露部位以外の臓器にも影響を及ぼす可能性があることを意味する。