

図3 擬似体液の種類による MWNT 表面での析出状態の SEM 観察（浸漬 2 週間）
 (a) PBS(+), (b) F 添加 PBS(+)

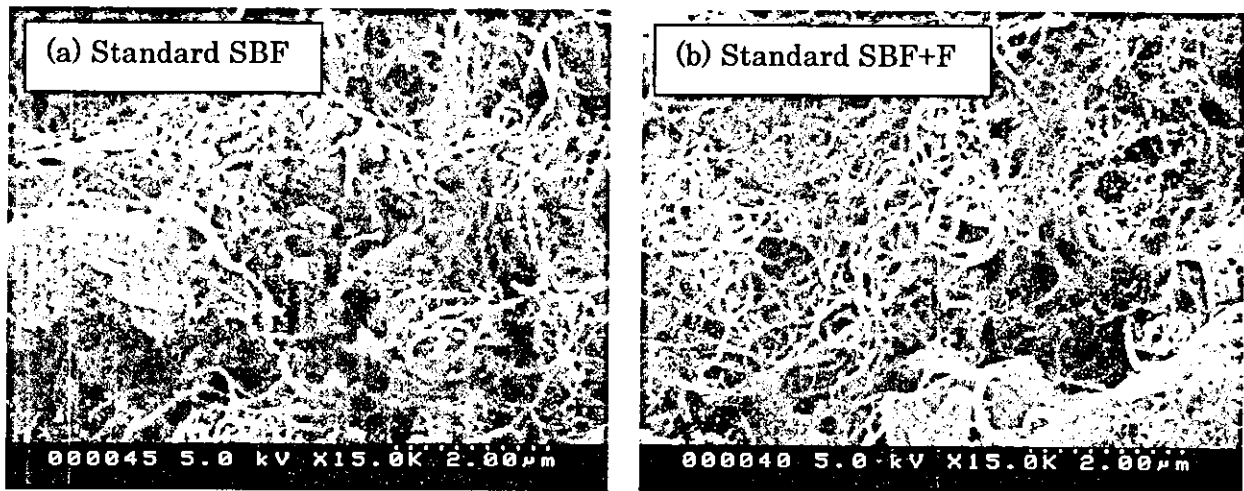


図4 擬似体液の種類による MWNT 表面での析出状態の SEM 観察（浸漬 2 週間）
 (a) SBF、(b) F 添加 SBF

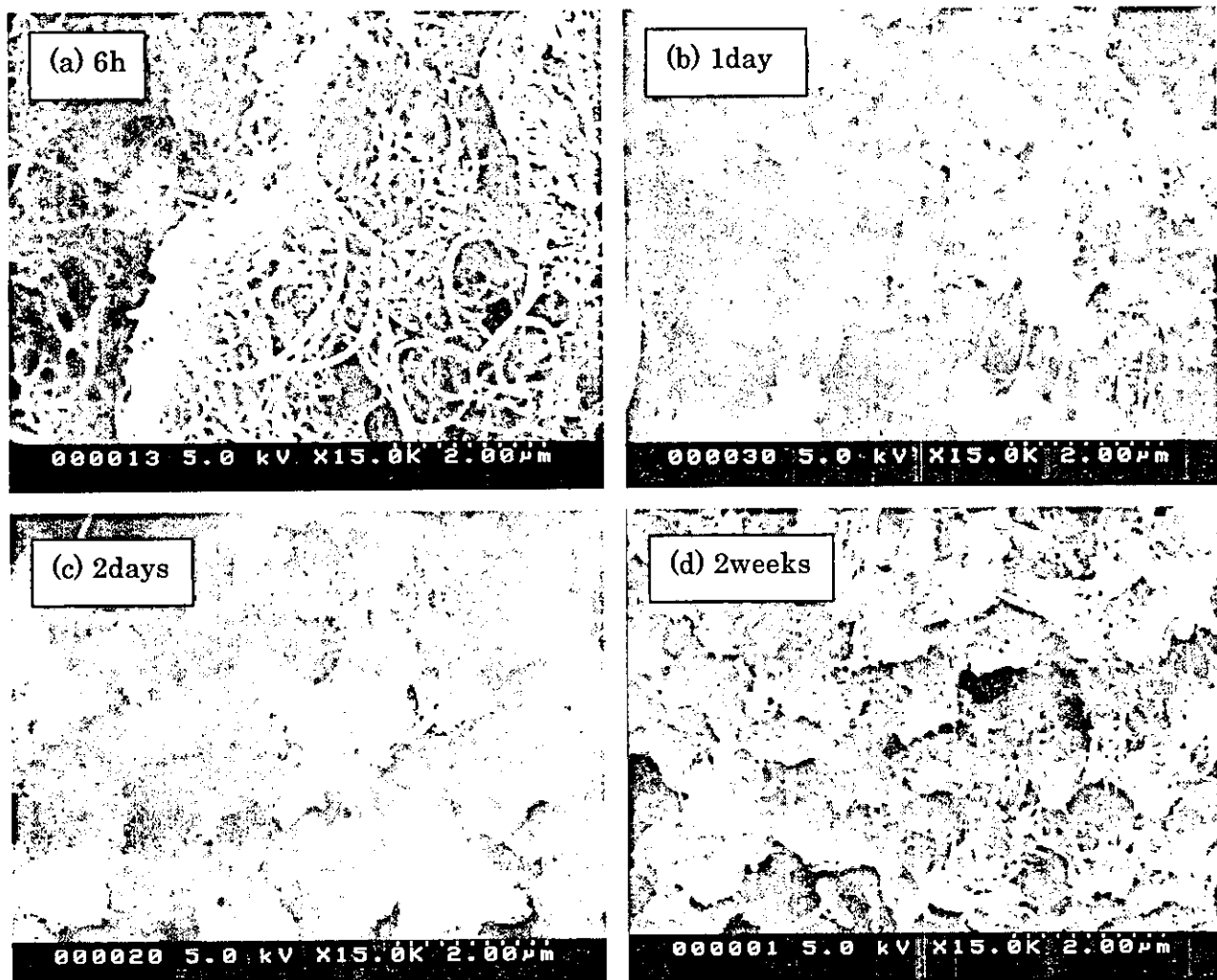


図5 PBS(+)で処理した MWNT 表面での析出の SEM 観察 (経時変化)

(a)浸漬 6 時間後、(b)浸漬 1 日後、(c)浸漬 2 日後、(d)浸漬 2 週間後

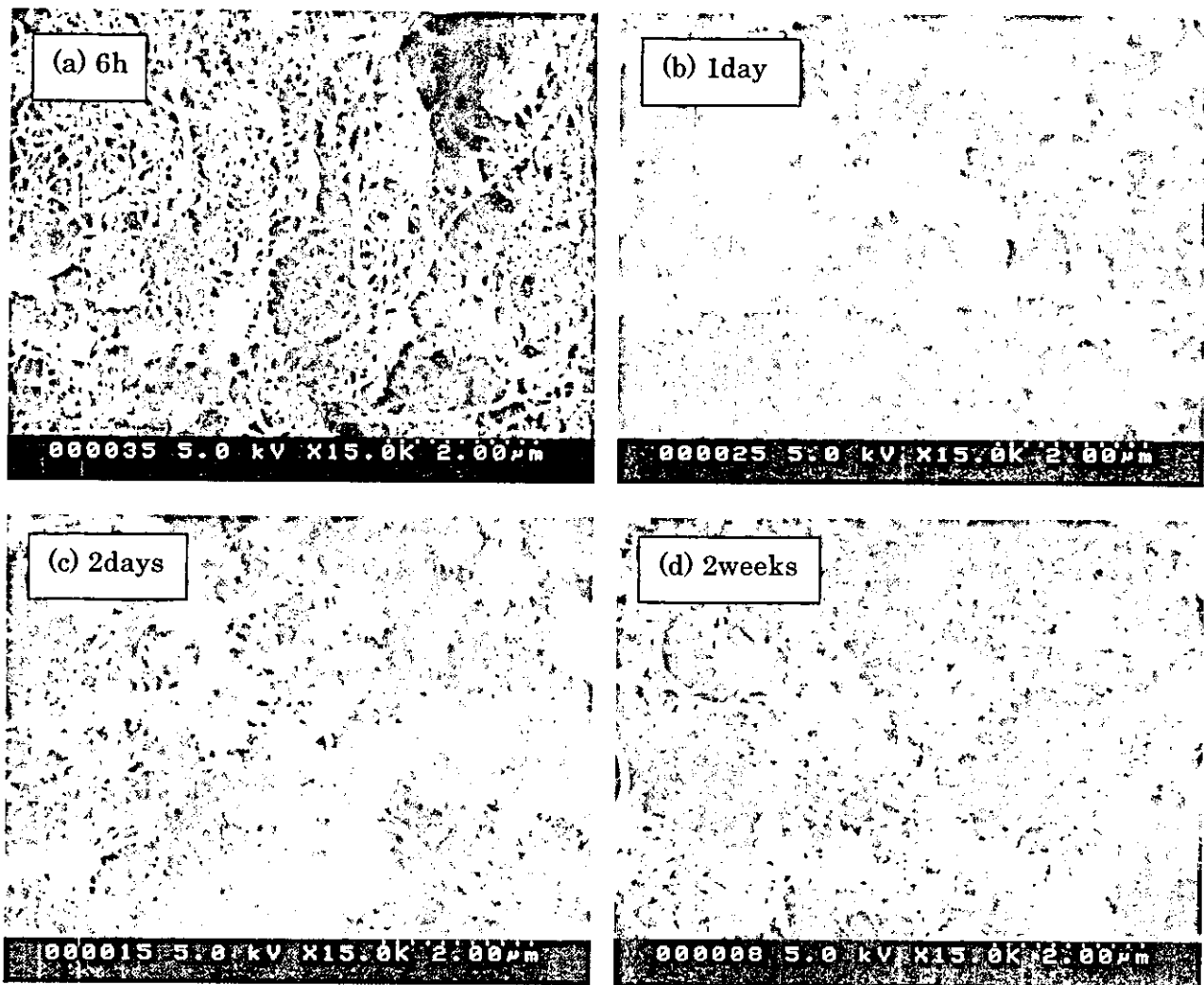


図6 F添加PBS(+)で処理したMWNT表面での析出のSEM観察(経時変化)
(a)浸漬6時間後、(b)浸漬1日後、(c)浸漬2日後、(d)浸漬2週間後

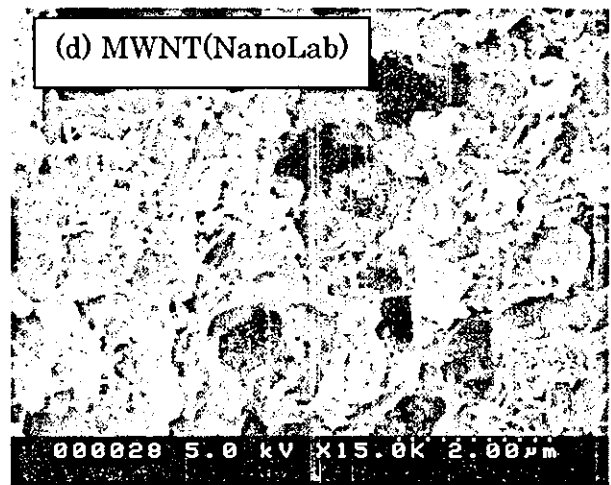
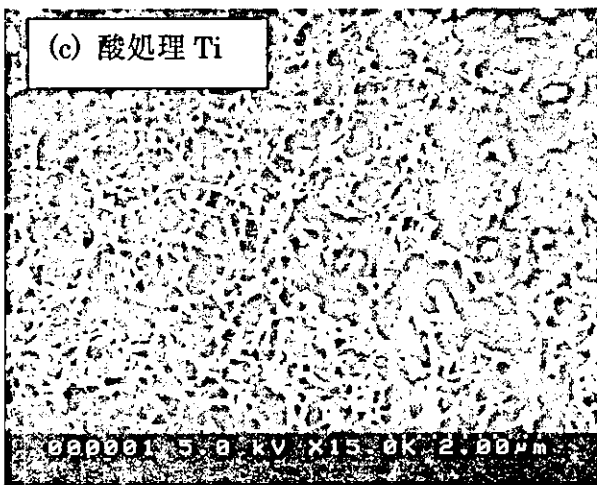
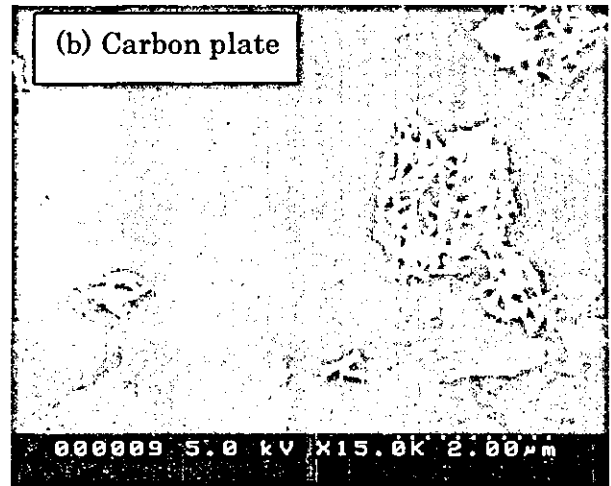
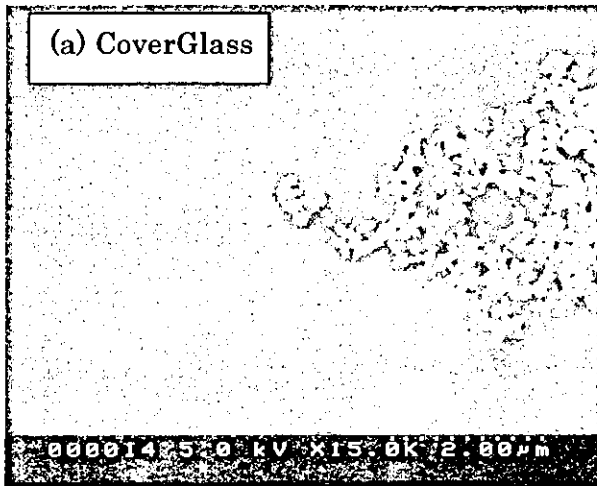


図7 PBS(+)で処理した MWNT 表面での析出の SEM 観察 (基材の影響)
(a) カバーガラス、(b) Carbon plate、(c) 酸処理チタン、(d) MWNT(NanoLab)

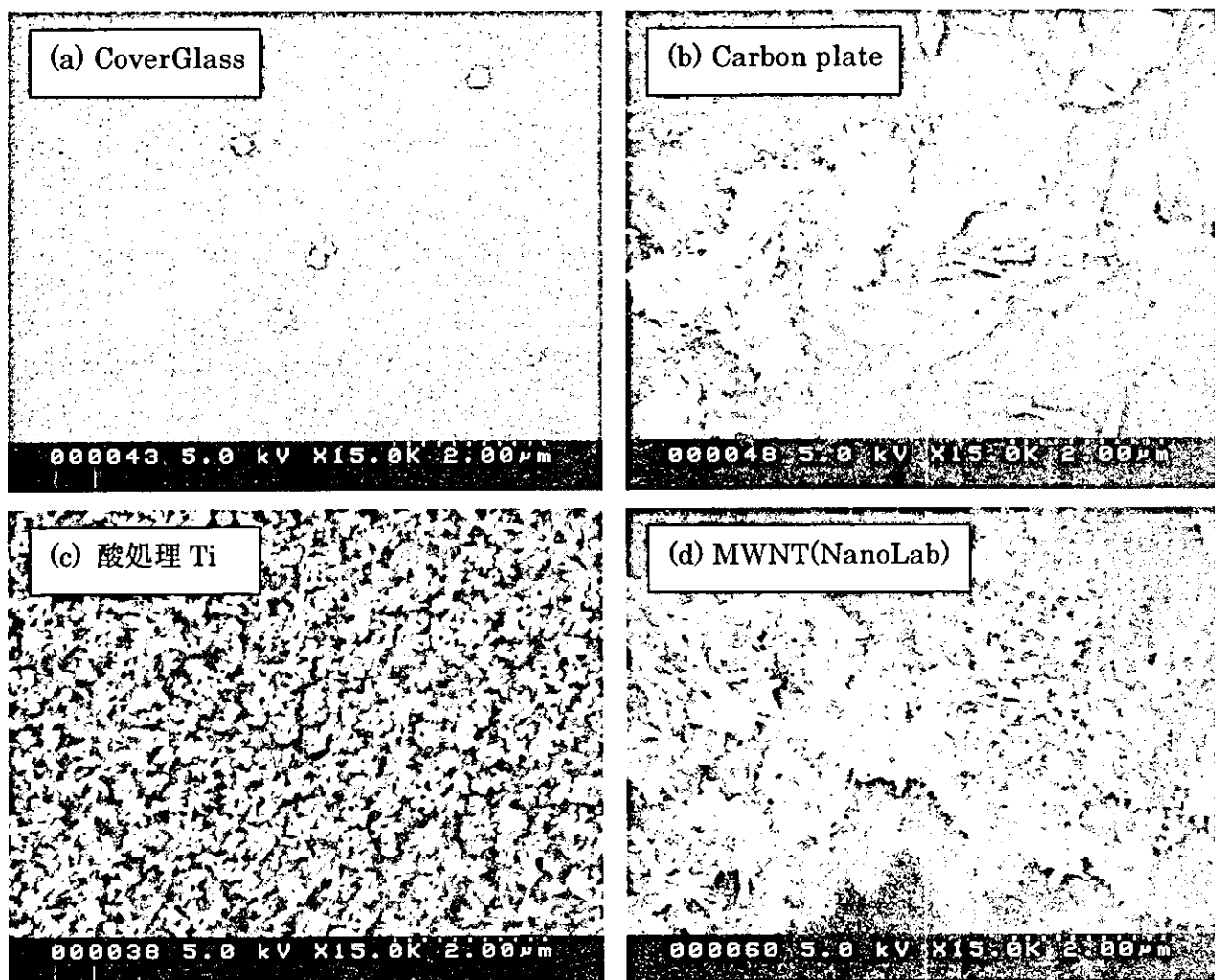


図9 F添加PBS(+)で処理したMWNT表面での析出のSEM観察(基材の影響)
(a) カバーガラス、(b) Carbon plate、(c) 酸処理チタン、(d) MWNT(NanoLab)

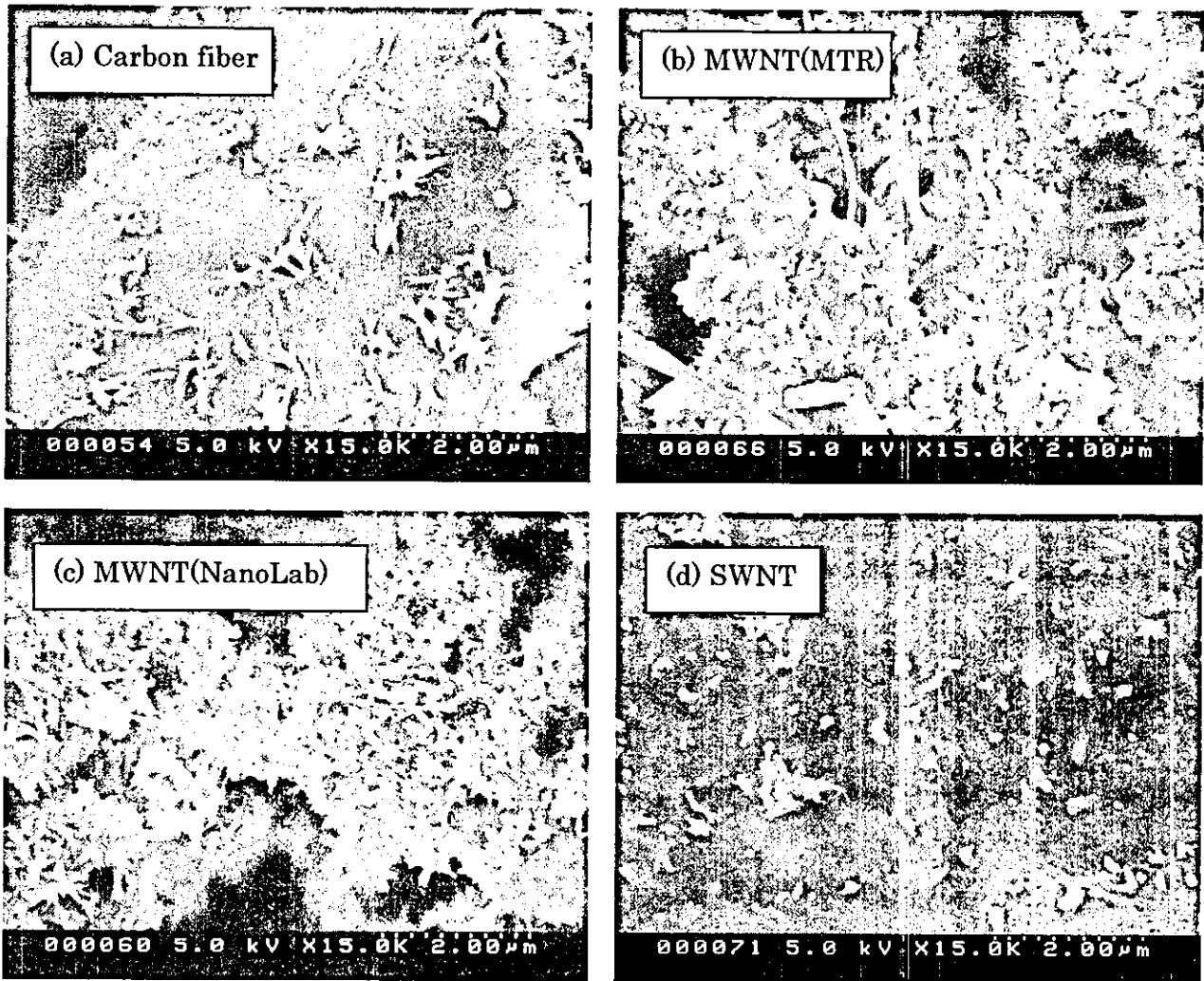


図10 F添加PBS(+)で処理したMWNT表面での析出のSEM観察(基材の影響)
(a)カーボンファイバー、(b)MWNT(MTR)、(c)MWNT(NanoLab)、(d)SWNT

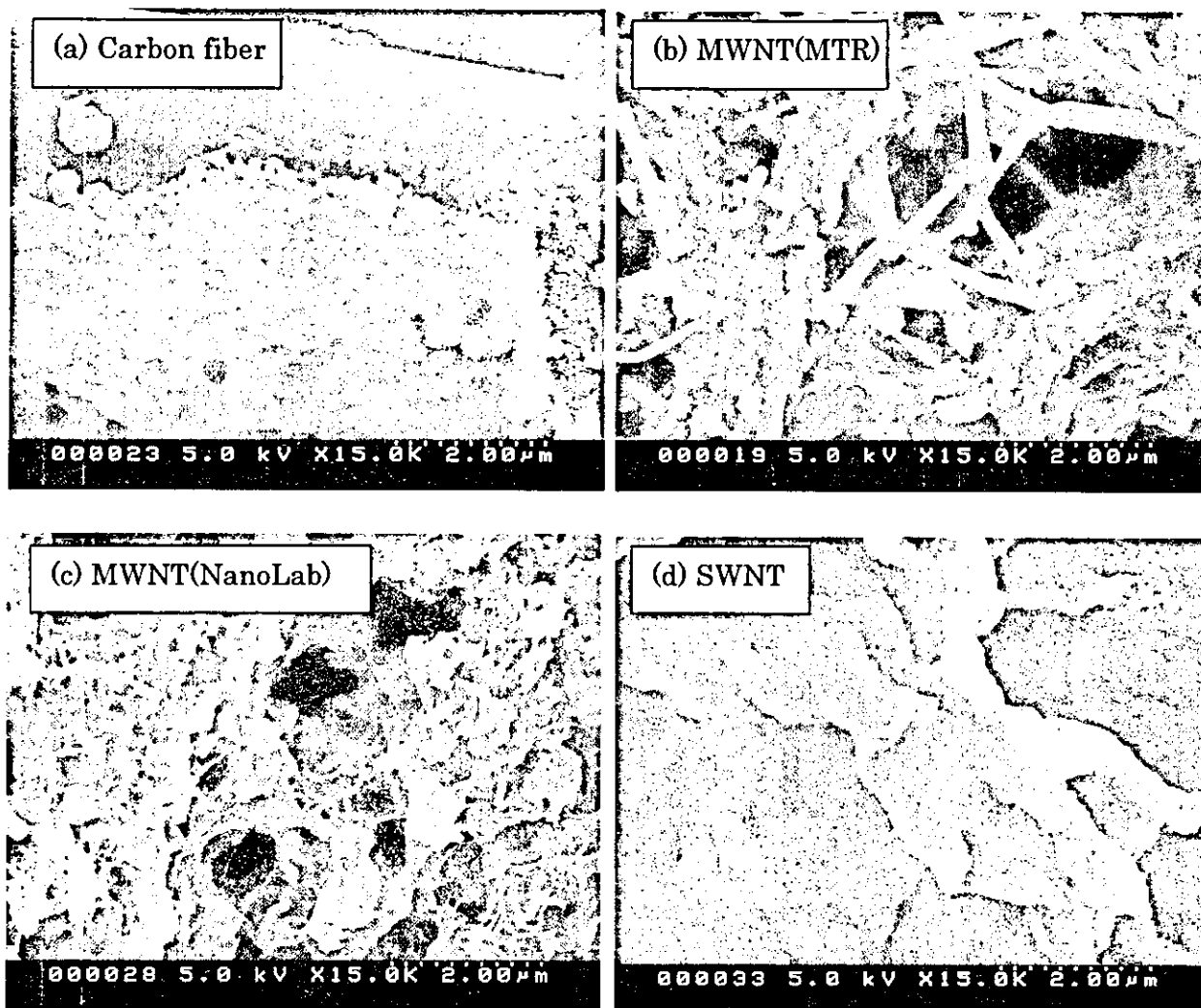


図8 PBS(+)で処理した MWNT 表面での析出の SEM 観察 (基材の影響)
(a) カーボンファイバー、(b) MWNT(MTR)、(c) MWNT(NanoLab)、(d) SWNT

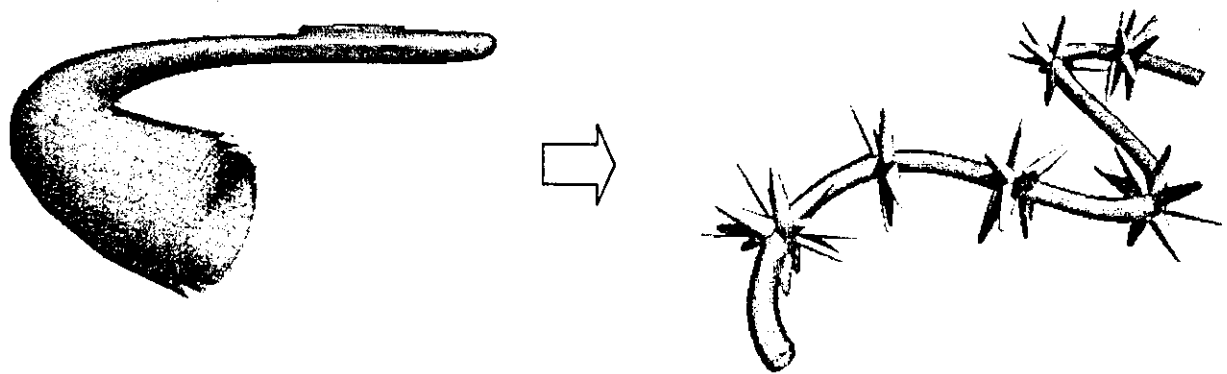


図 1 1 MWNT 表面でのアパタイトの析出の模式図

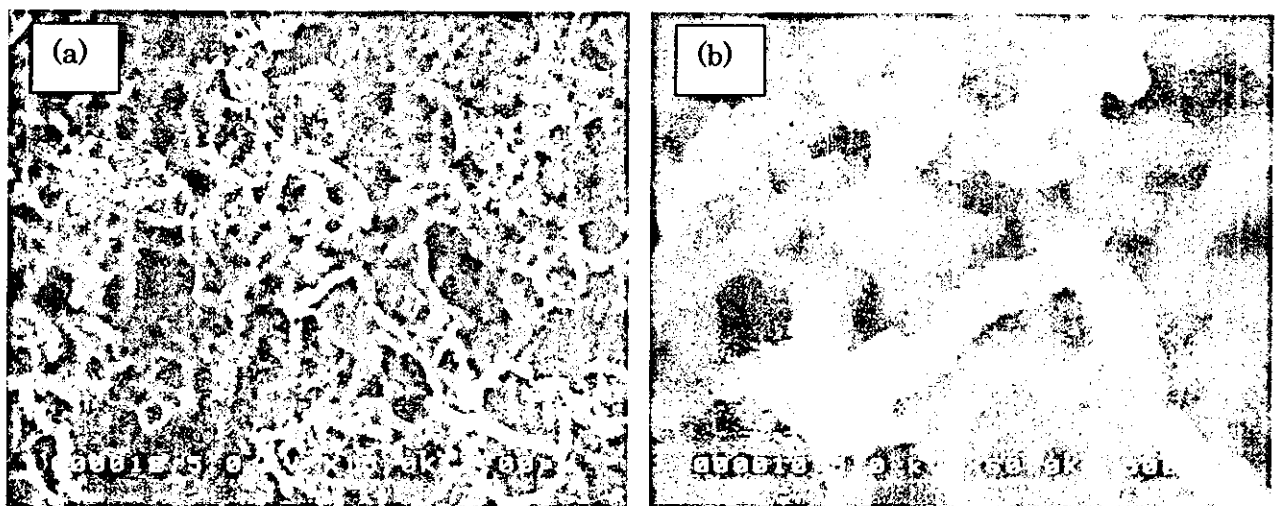


図 1 2 BSA-Gold と相互作用させた CNF の SEM
(a) CNF の SEM 像、(b) 強拡大像

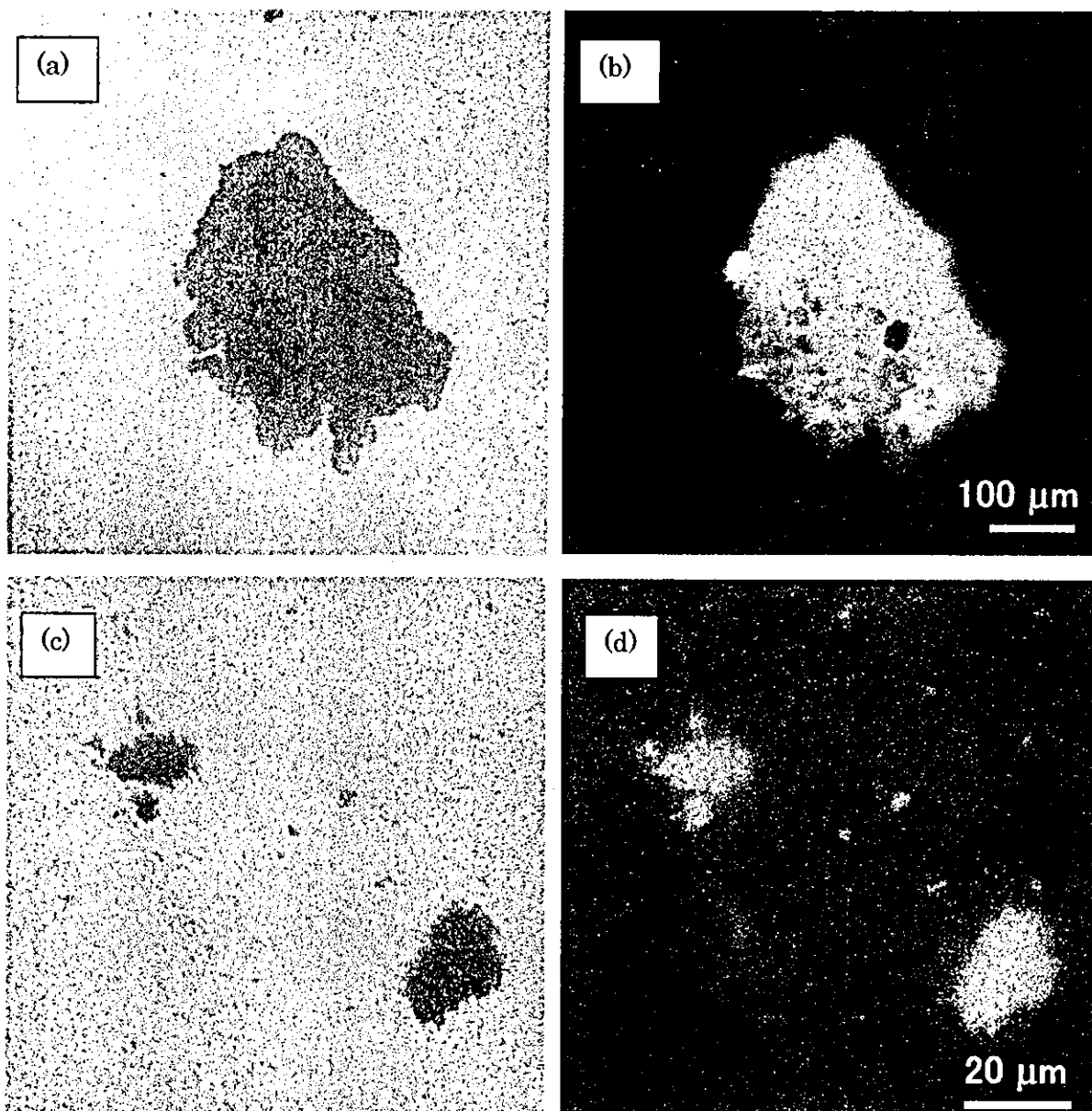


図13 蛍光ラベル BSA で処理した CNF の CLSM 像
(a) (c) 透過像、(b) (d) 蛍光像

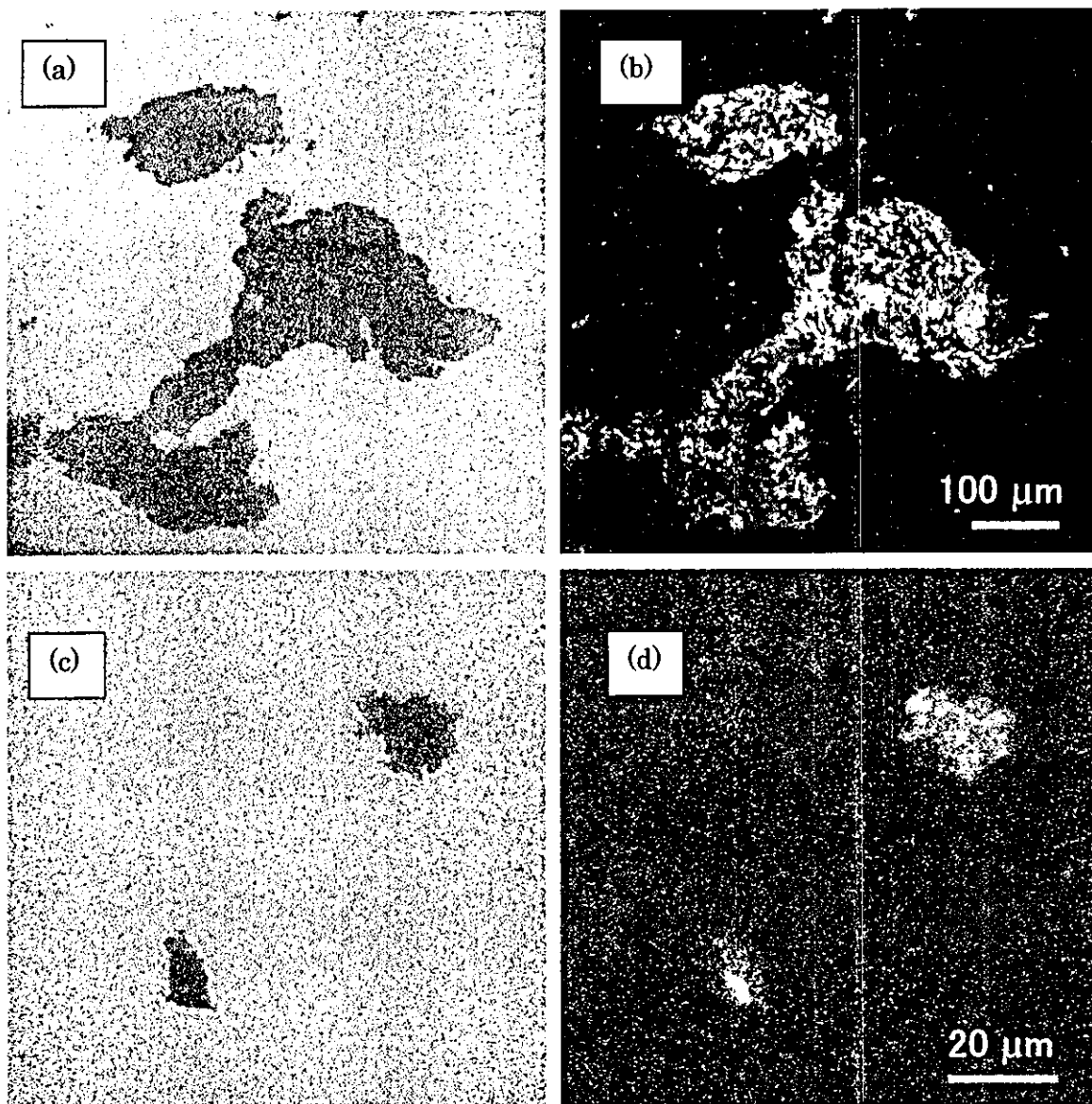


図14 蛍光ラベル Collagen で処理した CNF の CLSM 像
(a) (c) 透過像、(b) (d) 蛍光像

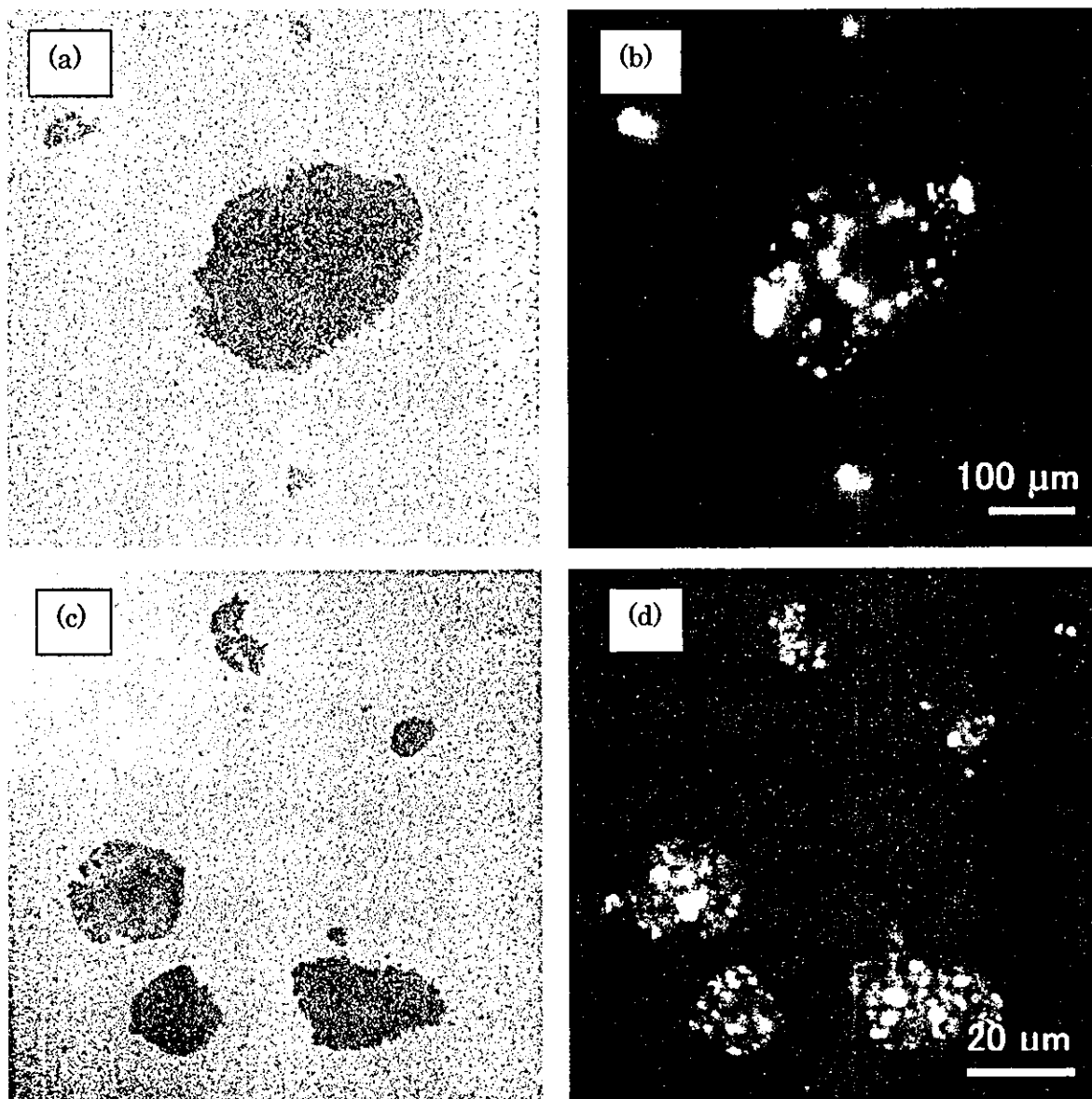


図15 蛍光ラベルPVLAで処理したCNFのCLSM像
(a)(c)透過像、(b)(d)蛍光像

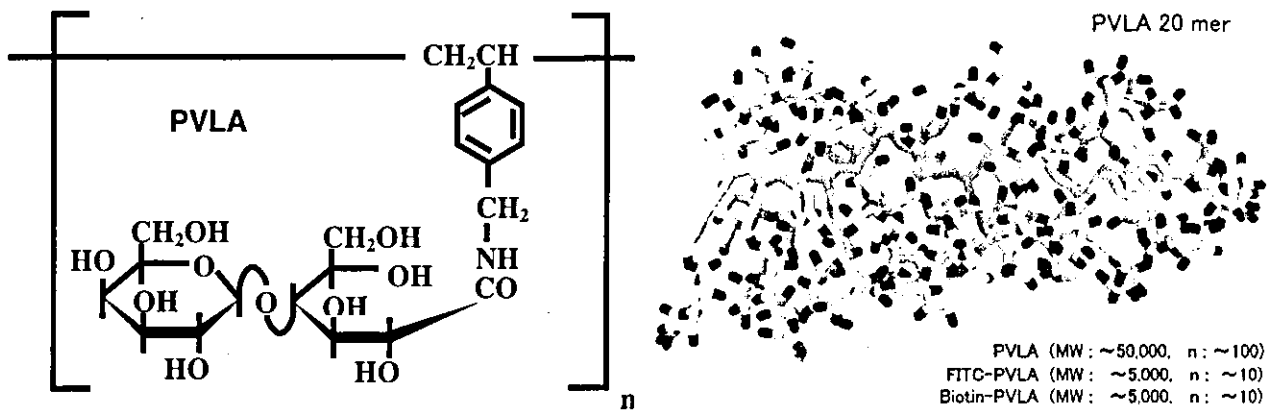


図16 PVLAの分子構造と分子モデリング(20mer)

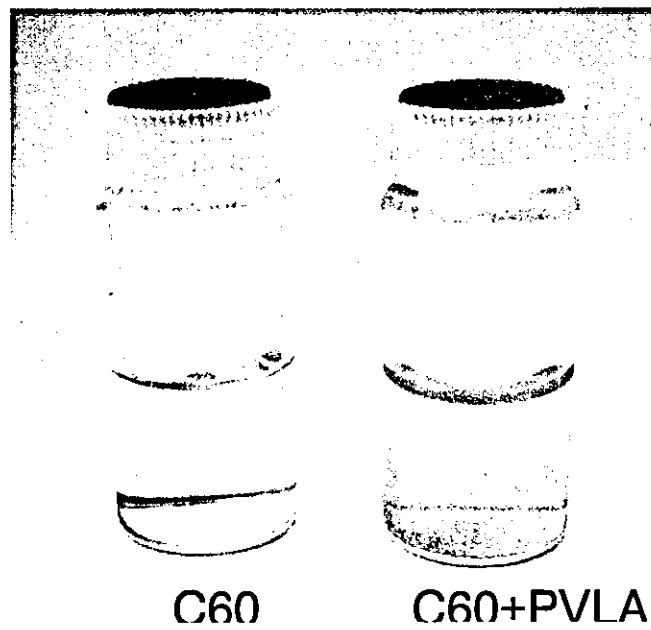


図17 PVLA処理後のフラーレン(C60)の分散状態

研究報告書

カーボンナノチューブならびにカーボンナノロッドによるマクロファージならびにマウス脾臓細胞の活性化

研究協力者 柴田 健一郎 北海道大学大学院歯学研究科教授

カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブがヒト由来マクロファージ系細胞株である THP-1 細胞ならびにマウス脾臓細胞を活性化するかどうかを調べた。これらは共に THP-1 細胞ならびにマウス脾臓細胞を活性化し、TNF- α の産生を誘導する活性を有していたが、その活性は微生物由来リポペプチドならびにリポ多糖体に比べて非常に弱かった。

A.研究目的

リポ多糖体、リポタンパク質、ペプチドグリカンなどの微生物由来物質はマクロファージや樹上細胞表面に発現している Toll-like receptor (TLR) で認識され、炎症性サイトカインなどの産生を誘導し、免疫系を活性化する(1-4)。

本研究では、カーボンナノロッド(CNR)ならびにカーボンナノチューブ(CNT)が異物として自然免疫系で認識されるかどうかを明らかにすることを目的としている。

前回は、両イオン性界面活性剤で可溶化した多層 CNT ならびに CNR が人由来マクロファージ系細胞である THP-1 細胞を活性化することを報告したが、この活性化が使用した界面活性剤の影響ではないかという疑問が残った。そこで、今回は、界面活性剤を使用しない方法で処理した種々の CNT ならびに CNR が THP-1 細胞を活性化するかどうかを明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

1. サンプルならびにその処理方法

1) 東北大学の田路研究室で調製された以下のサンプルを用いた。

HSW2: 長さ数十 μm 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。

さらに、以下のサンプルを用いた。

CNF: acid cut CNF 031003

NL2: acid cut NL2 MW 031003

ENL2: ET,ozon cut NL2 MW 031003

2) 古月等の方法で調製したサンプル

東北大学の田路研究室が作製した CNR (直径は 50-300 nm, 長さは, 2-20 μm) ならびに NANO LAB 社製の MWCNT (純度は 80%, 直径は 5-20 nm, 長さは 5-20 μm) をアルギン酸で可溶化した。

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% human serum を含む RPMI 1640 培地 200 μl 中に 5×10^5 個の THP-1 細胞を懸濁させ、カーボンナノロッド (原液 2 ppm) ならびにカーボンナノチューブ懸濁液 (原液 0.1 ppm) の原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液の 10 μl 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。

3. 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 1×10^7 個脾臓細胞を加え、原液 (最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、10 倍希釈液 (最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、100 倍希釈液 (最終濃度 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 16 時間刺激した。全 RNA を調製し、RT-PCR 法により TNF- α の mRNA の発現を調べた。

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- κB 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (pNF- κB luciferase reporter

plasmid) とともに human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に遺伝子導入し、0.01 ならびに 0.1 ppm のカーボンナノロッドで 6 時間刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果ならびに考察

8 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- α 産生を誘導した。しかしながら、そのレベルは微生物由来リポペプチド FSL-1 の 2000 分の 1 程度であった (図 1A)。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 に比べて非常に弱く、濃度依存性もみられなかった (図 1B)。

アルギン酸で可溶化した CNT ならびに MWCNT は、可溶化に用いたアルギン酸そのものが THP-1 細胞の活性化能を有していたために、CNT ならびに MWCNT の活性化を評価できなかった (図 2)。

HSW2, R102, R2, NGC3 ならびに 817ND が TLR2 に認識されるかどうかを調べたところ、これらはすべて TLR2 により認識されないことがわかった (図 3)。

さらに、生体防御において中心的な役割を果している免疫系に及ぼす影響を調べるために、今回はまずマウス脾臓細胞の活性化能を調べた。HSW2, R102, R2, NGC3 ならびに 817ND は、陽性コントロールとして用いた大腸菌 LPS よりも弱いものの、マウス脾臓細胞を活性化し、TNF- α の mRNA の発現を誘導し、そのレベルは HSW2 が最も強いことがわかった。また、その活性化能は濃度に反比例していた。このことは濃度が薄いほど良く分散しており、濃度が高いと凝集をおこしたためではないかと推測される。

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を介してNF- κ Bの活性化能を有していなかった。この相違は、サンプルの処理方法、分散している溶媒の種類ならびにサンプルのサイズ等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えることは、カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブは、微生物由来物質に比べるとその活性は非常に弱いながらも、単球・マクロファージを活性化する能力を有している。また、リンパ球が約90%を占める脾臓細胞を活性化するということから、微生物ほどではないが、カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブは生体にとって異物として認識されるものと推測される。

文献

1. K. Shibata, A. Hasebe, T. Into, M. Yamada and T. Watanabe. The N-terminal lipopeptide of a 44 kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. **J. Immunol.** 165: 6538-6544, 2000.
2. M. Fujita, T. Into, M. Yasuda, T. Okusawa, S. Hamahira, Y. Kuroki, A. Eto, T. Nisizawa, M. Morita and K. Shibata. Involvement of leucine residues at positions 107, 112 and 115 in a leucine-rich repeat motif of human Toll-like receptor 2 in the recognition of diacylated lipoproteins and lipopeptides and *Staphylococcus aureus* peptidoglycans. **J. Immunol.** 171: 3675-3683, 2003.
3. Into T, Kiura K, Yasuda M, Kataoka H, Inoue N, Hasebe A, Takeda K, Akira S, Shibata KI. Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- κ B activation. **Cell. Microbiol.** 6:187-199, 2004.
4. T. Okusawa, M. Fujita, J. Nakamura, T. Into, M. Yasuda, A. Yoshimura, Y. Hara, A. Hasebe, Douglas T. Golenbock, M. Morita, Y. Kuroki, T. Ogawa and K. Shibata. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6. **Infect. Immun.** 72 : 1657-1665, 2004.

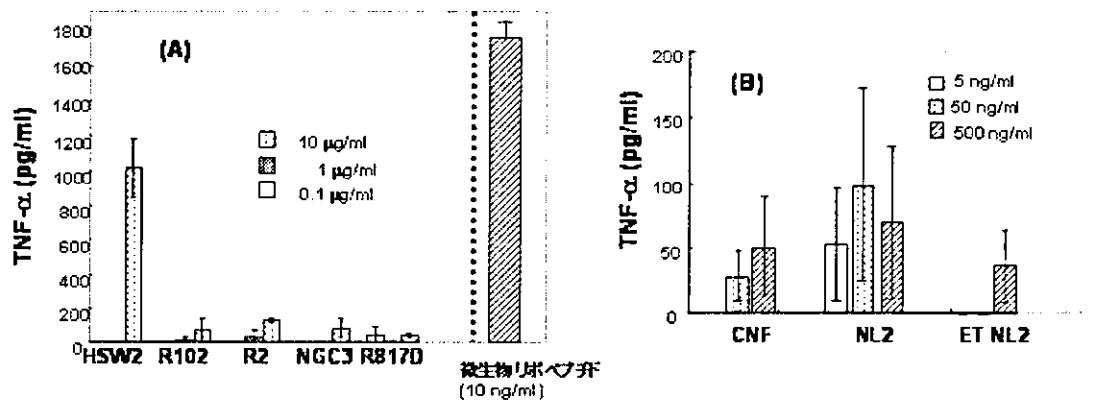


図1. THP-1 細胞のカーボンナノチューブならびにナノロッドによる活性化

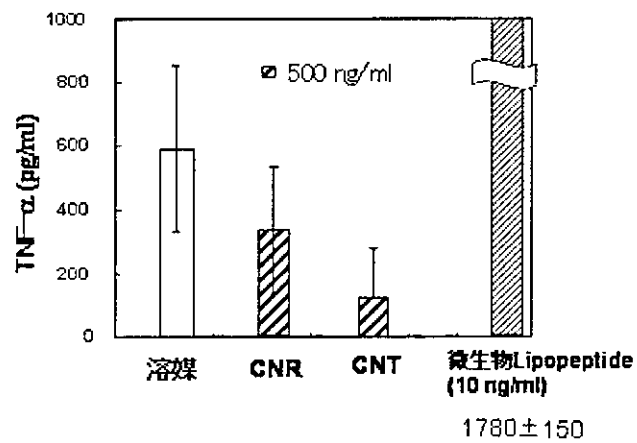


図2. アルギン酸で可溶化CNTならびに CNRによる THP-1細胞の活性化

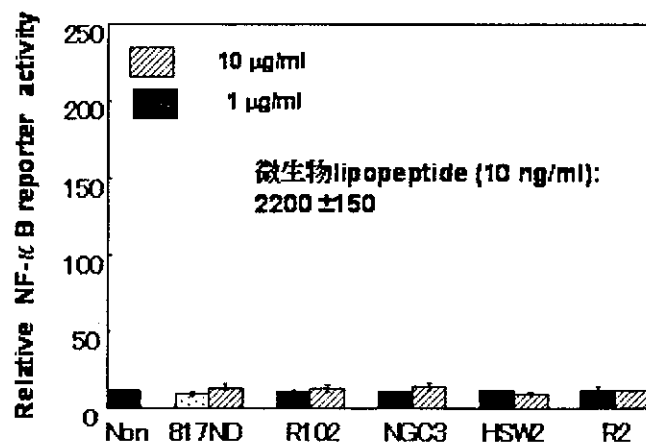


図3. TLR2を導入したHEK293細胞による転写因子NF- κ Bの活性化

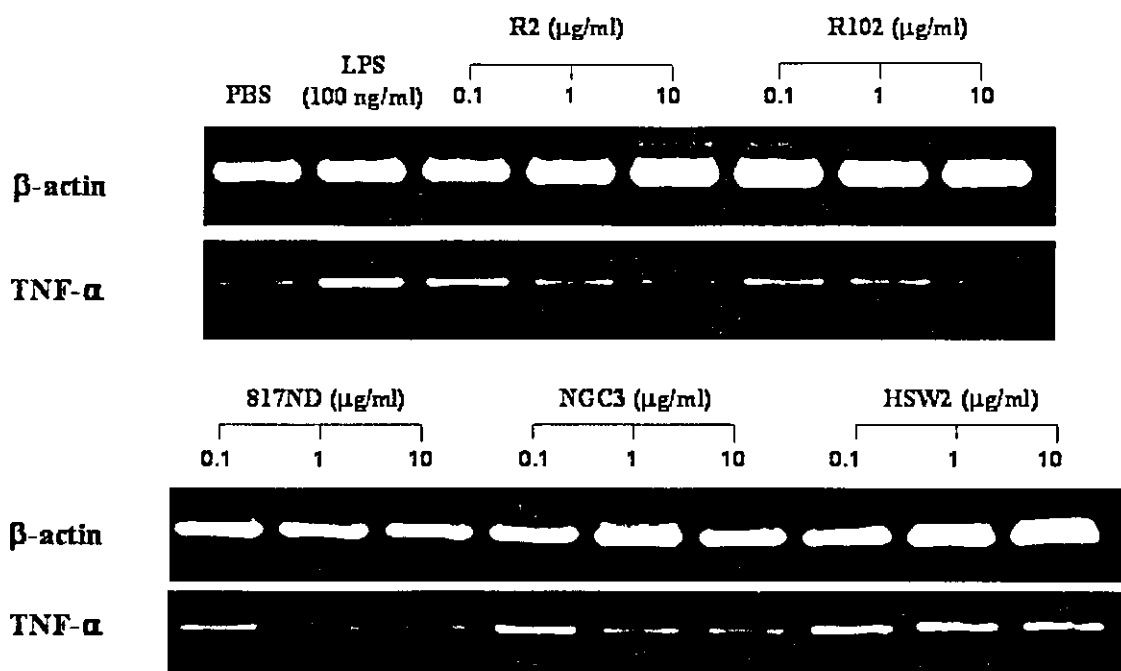


図4. マウス(C57BL/6)脾臓細胞からのTNF- α mRNAの発現誘導

カーボンナノチューブによる細菌の吸着

主任研究者 巨理 文夫（北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座）

研究協力者 木浦 和人、柴田 健一郎

（北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座）

A. 研究目的

我々は、カーボンナノチューブ (CNT) が様々な物質を吸着するのではないかと推測している。そこで、本研究では CNT が全唾液あるいは細菌培養液中の細菌を吸着するかどうかを調べた。

B. 研究方法

1. CNT による全唾液中の細菌の吸着

全唾液をマイクロチューブに 1 ml ずつ分注し、CNT (NanoLab 社製の NWCNT, NO.4, 未精製品) をそれぞれ 5 mg、10 mg、20 mg を加え、vortex ミキサーで混合した。1 時間静置した後、上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^3 \sim \times 10^6$) 後、BHI 寒天培地に 100 μ l 塗抹し、15 時間後にコロニー数をカウントした。(fig.1)

2. CNT による *Streptococcus mutans* JC2 の吸着

BHI 液体培地に NWCNT を 5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml になるように加え、 4×10^6 cfu の *S. mutans* を接種し 37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。3、6、9、12、15 時間後に vortex ミキサーで 10 秒間混合し、1 分間静置してから上清を回収した。回収した上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^3 \sim \times 10^8$) 後、BHI 寒天培地に 100 μ l 塗抹し、48 時間嫌気培養後にコロニー数をカウントした。(Fig.2) また、15 時間後の培養液中の CNT を回収し、細菌と CNT との吸着の様子を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。(Fig.3)

3. CNT による *Escherichia coli* K12 の吸着

普通ブイヨン培地に NWCNT を 5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml になるように加え、 2×10^5 cfu の *E. coli* を接種し、37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。2、4、6、8 時間後に vortex ミキサーで 10 秒間混合し、1 分間静置してから上清を回収した。回収した上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^5 \sim \times 10^{10}$) 後、普通寒天培地に 100 μ l 塗抹し、10 時間培養した後にコロニー数をカウントした。(Fig.4)

C. 結果ならびに考察

全唾液中の生菌数 (3.6×10^7 cfu/ml) は CNT の濃度依存的傾向を示し、最も高濃度 (20 mg/ml) の CNT 処理で生菌数が 2.6×10^6 cfu/ml まで減少していた。また、*S. mutans* ならびに *E. coli* の培養液に種々の濃度の CNT を加えたところ、CNT の濃度に依存して培養上清中の菌数が減少していた。実際、培養上清の透明度が CNT の濃度に依存して増していることが肉眼でも観察された。SEM の結果では、*S. mutans* が CNT のファイバーに入り込んでいる様子や菌体に CNT が絡みついている様子などが観察された。

以上のことから、CNT は細菌の菌体を吸着することができるものと推測される。