

Fig.1 カーボンナノチューブによる全唾液中の細菌の吸着

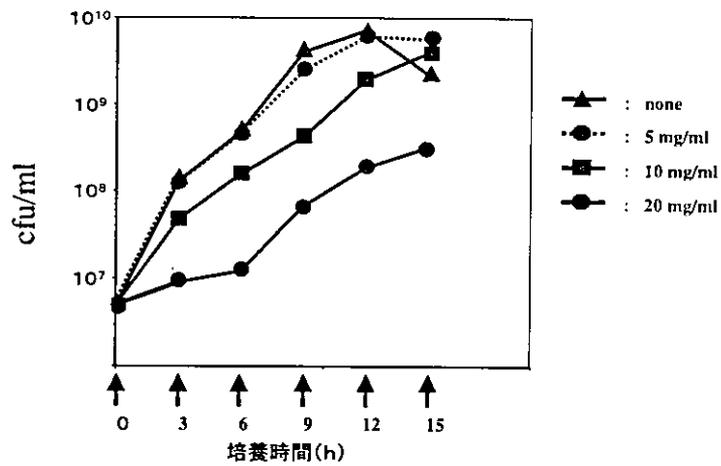


Fig.2 カーボンナノチューブによる*S. mutans*の吸着

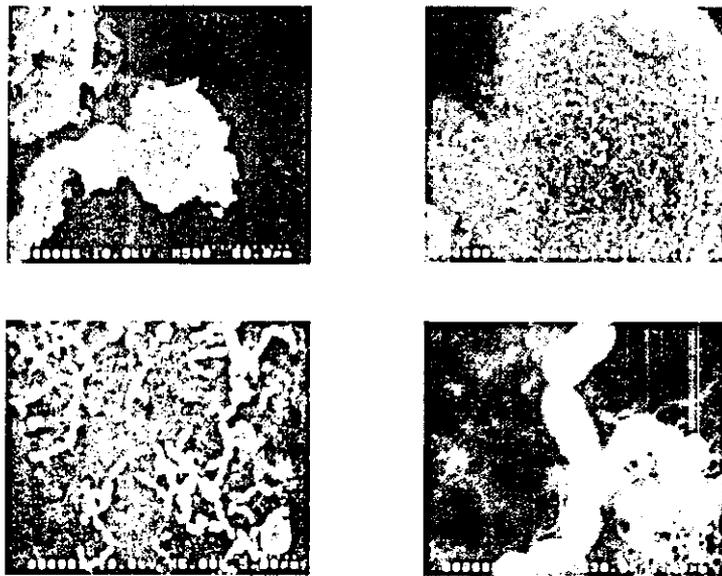


Fig.3 細菌とカーボンナノチューブとの吸着 (SEM)

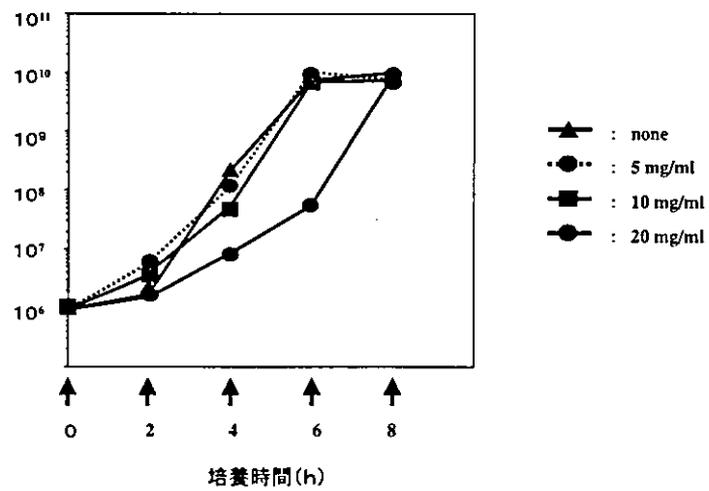


Fig.4 カーボンナノチューブによる *E. coli* の吸着

## カーボンナノチューブ・ファイバーの歯根膜由来細胞株培養系 における細胞増殖活性ならびアルカリフォスファターゼに及ぼす影響

主任研究者 百理文夫 北海道大学大学院歯学研究科教授  
研究協力者 田村正人 北海道大学大学院歯学研究科教授

**研究要旨** 医用ミニブタ歯根膜組織から分離した細胞をヒト telomerase 遺伝子の導入により不死化した培養細胞株 (TesPDL cell) を確立した。これらの細胞間の各種 mRNA の発現を調べたところ、細胞株により異なる発現を呈していた。本研究では、これら3つのミニブタ由来歯根膜細胞株 TesPDL-3, 11, 12 を用い、可溶化処理しサイズ制御したカーボンナノチューブならびにファイバーが、細胞増殖活性ならびに細胞機能にどのような影響を及ぼすか調べ、カーボンナノ/マイクロ微粒子の反応性が細胞特異性を有するかどうかを明らかにすることを目的とした。可溶化処理しサイズ制御したカーボンナノチューブならびにファイバーをこれらの細胞に添加し培養したところ、細胞間でカーボンナノチューブならびにファイバーのサイズならびに添加量により DNA 合成量が異なっていた。また、細胞のアルカリフォスファターゼ活性に対しても細胞間でカーボン分子のサイズならびに添加量により異なる反応が見られた。これらの結果から、カーボンナノチューブならびにファイバーの細胞増殖ならびに細胞機能に与える影響は、そのサイズのみならず細胞の形質・種類によって異なること、すなわちカーボンナノチューブ・ファイバーの細胞に対する作用には細胞特異性があることが明らかとなった。

### A. 研究目的

生体を構成する元素としては炭素、酸素、水素、窒素、カルシウム、リンが主な構成元素であり、炭素は人体の構成元素組成の50%を占める主要な元素成分である。従来からグラファイト、ダイヤモンド、無定形炭素の3つが炭素からなる同位体として知られている。しかし、近年 C60 フラーレンと呼ばれるサッカーボール状分子をはじめとした高次のフルラーレンが次々と発見されてきた。また、筒状のナノスケール分子としてカーボンナノチューブが見出された。この炭素元素より成

るカーボンナノチューブを、生体へ何らかの形で応用するための基盤として、まずそれらの分子の生体に対する作用とその分子メカニズムを明らかにすることが必須である。

研究協力者の田村らは、鹿児島大学生命科学資源開発研究センター医用ミニブタ研究部門と共同で、歯周組織のひとつである歯根膜の機能を分子レベルで検討するためのモデル系を確立することを目的として歯根膜組織由来の培養細胞株を樹立することを試みた。この樹立した細胞株間においてさまざまな形質が異なっていた。そこでこれらの細胞培養系

を用い、いくつか異なる処理をしたカーボンナノファイバー・ナノチューブの細胞増殖活性ならびに細胞機能に与える影響について調べ、カーボンナノ/マイクロ微粒子の細胞に対する反応性の相違を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

<材料> 強酸処理によって切断、可溶化しサイズ制御した以下のそれぞれ3種類の多層カーボンナノチューブならびにカーボンナノファイバーを実験に使用した。

a: ac\_size\_825nm\_NL2\_MW\_031126a

(NanoLab 社製)

b: ac\_size\_550nm\_NL2\_MW\_031126b

(NanoLab 社製)

c: ac\_size\_220nm\_NL2\_MW\_031126c

(NanoLab 社製)

d: PC\_2μm\_cake\_CNFs\_040207a (田路研製)

e: PC\_0.4μm\_cake\_CNFs\_040207b (田路研製)

f: PC\_0.1μm\_cake\_CNFs\_040207c (田路研製)

<方法>

### 【歯根膜細胞株の樹立】

雄 28 ヶ月齢クラウン系医用ミニブタ (ジャパンファーム, 鹿児島) の下顎より前臼歯を抜去し, Somerman らの方法により歯根膜組織を採取し培養した。すなわち歯根中央部に付着した組織を剥離し, I 型コラーゲンコートした dish にて 10%FBS, FGF2 を含む F12HAM 培地中で細胞を out growth させた。この細胞にヒト telomerase 発現 plasmid (pCI-neoTERT, Dr. R. Weinberg) をリン酸カルシウム法によりトランスフェクトした。G418 による選択後, 限外希釈法にてクローニングし不死化した歯根膜由来細胞株 (TeSPDL cell) を樹立した。

### 【歯根膜細胞株の Characterization】

ミニブタ歯根膜由来細胞株 TeSPDL-11, 12 を, 10%ウシ胎児血清を加えた F12HAM 培地にて 5%CO<sub>2</sub>, 95%Air の条件下にて I 型コラーゲンコートした細胞培養用プラスチック dish

上で培養した。これらの細胞より, Isogen を用い total RNA を抽出した。Total RNA の 1 ug を逆転写酵素 (reverse transcriptase, Qiagen) を用いて cDNA を合成した。これらの cDNA を鋳型として, 種々の mRNA の塩基配列から設計した 2 種類の各種オリゴヌクレオチドプライマーを使用し PCR 法を行なった。PCR 産物を 2%アガロースゲルにて電気泳動し, 紫外線照射下でデジタルカメラにて撮影し, 種々の遺伝子の発現を調べた。

【歯根膜細胞株に対する多層カーボンナノチューブならびにカーボンナノファイバーの影響】

これらの細胞を, 0.125%トリプシン, 0.5%EDTA 溶液 (Sigma 社) を用い dish より剥離させ, 1X10<sup>4</sup>/ml ならびに 1X10<sup>5</sup>/ml の濃度で 24-well dish に 0.5 ml の培地を用いて播種し, 24 時間後に種々の量の可溶化しサイズ制御したそれぞれ 3 種類の多層カーボンナノチューブならびにカーボンナノファイバーを培地中に添加し引き続き培養を行なった。カーボンナノチューブ/ファイバーは原液として 10 ppm の濃度のものを用いた。

48 時間後, DNA 合成量について BrdU を用いた ELISA 法によって測定し, それぞれの細胞の増殖に与える影響を調べた。この方法では, 培養細胞に 10 μM の BrdU 40 μl を加えて 2 時間培養し, BrdU の取り込みを行った。BrdU 標識試薬を除去後, 細胞固定化剤を加えてインキュベーションし細胞を固定させた。その後, 固定化剤を除去し, ブロッキング剤を加えてブロッキング処理を行った。ブロッキング後, Peroxidase 標識 BrdU 抗体を加えた。Tetramethylbenzidine を基質として Peroxidase 酵素反応を行い, 450nm の吸光度を分光光度計で測定した。

また, 細胞の機能に対する影響について, 骨芽細胞の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を, 活性染色法を用いて測定した。活性染色

法は bromo chloro indolylphosphate (BCIP) ならびに nitroblue tetrazolium (NBT) を使用した。すべての実験は独立した実験として複数回行い、それらの結果を t 検定を用いた統計処理を行い解析した。

### C. 研究結果

雄 28 ヶ月齢クラウン系医用ミニブタより下顎前臼歯を抜去し、Somerman らの方法により歯根膜組織を採取し培養した。すなわち歯根中央部に付着した組織を剥離し、I 型コラーゲンコートした dish にて 10%FBS, FGF2 を含む F12HAM 培地中で細胞を out growth させた (図 1)。この細胞を限外希釈法にてクローニングし不死化した歯根膜由来細胞株

(TeSPDL cell) を樹立した。TeSPDL-11, 12 細胞を位相差顕微鏡で観察した (図 2, 3) ところ、いずれの細胞も繊維状の線維芽細胞に近い形態が観察されたが、その形態は異なっていた。RT-PCR 法を用い mRNA 発現を検討したところ TeSPDL-11 細胞は TeSPDL-12 細胞と比較してアルカリフォスファターゼ (ALP) ならびに Runx-2 mRNA がいずれも強く発現していた。

TeSPDL-3, 11 ならびに 12 細胞に 3 種類のサイズの多層カーボンナノチューブもしくは 3 種類の acid\_cut ナノファイバーを種々の濃度で添加し BrdU の取り込みを指標とした DNA 合成量を検討した (図 4, 5, 6)。TeSPDL-3 細胞においては、5  $\mu$ l の ac\_size\_550nm\_NL2\_MW を添加した場合 DNA 合成量の増加が見られた。また、25  $\mu$ l の PC\_2 $\mu$ m\_cake\_CNFs\_040207a および 25  $\mu$ l の PC\_0.4 $\mu$ m\_cake\_CNFs\_040207b の添加によって DNA 合成量は低下した。しかしながら他の多層カーボンナノチューブもしくは acid\_cut ナノファイバーを添加しても DNA 合成量に変化は認められなかった (図 4)。

TeSPDL-11 細胞においては、10  $\mu$ l の PC\_2 $\mu$ m\_cake\_CNFs\_040207a の添加により DNA

合成量が減少した (図 5) が、TeSPDL-12 細胞においては変化が見られなかった (図 6)。10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l の ac\_size\_825nm\_NL2\_MW\_031126a, 25  $\mu$ l の PC\_0.1 $\mu$ m\_cake\_CNFs\_040207c の添加によって TeSPDL-12 細胞では DNA 合成量が低下したが、TeSPDL-11 細胞においては変化が見られなかった。

ALP 活性染色では、TeSPDL-3 細胞はその活性が高い細胞であるが 3 種類のサイズの多層カーボンナノチューブもしくは 3 種類の acid\_cut ナノファイバーの添加により濃度依存的な ALP 活性の低下が見られた (図 7)。しかしながら、TeSPDL-11 および 12 細胞においては 3 種類のサイズの多層カーボンナノチューブもしくは 3 種類の acid\_cut ナノファイバーの添加による ALP 活性の変化は認められなかった (図 8, 図 9)。

### 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あるサイズのカーボンナノチューブならびにファイバー分子は、何らかのメカニズムを介して、細胞の増殖活性ならびに ALP 活性に対して影響を与えることが考えられた。

本研究で使用した 3 種類の細胞 TeSPDL-3, 11 ならびに 12 細胞では、形態ならびに mRNA 発現に違いが見られたことから、異なる形質を有していることと考えられる。それぞれの細胞に対するカーボンナノチューブならびにファイバー分子の細胞増殖活性ならびに ALP 活性に違いがみられたことから、ナノ粒子の細胞に対する作用には細胞特異性があることが考えられた。前年の研究においても C2C12 細胞と MC3T3-E1 細胞の細胞増殖活性に対するカーボンナノチューブならびにファイバー分子の作用が異なることから、この細胞の種類による特異的があることをさらに支持さ

れると考えられた。

これらの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、水懸濁状態であり、細胞表面の何らかの受容体の構造変化を介して、その細胞内シグナル伝達機構を活性化しうる可能性がまず考えられた。

また、サイズ制御された微細な粒子の細胞そのものに対する物理的刺激性である。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、本研究で見られた細胞間における反応性の違いをもたらした可能性が考えられた。

さらに、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 cytochalasin 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歯根膜細胞とは、異物処理といった機能は異なるものと考えられる。本研究で用いたナノファイバー・チューブが、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

医用ミニブタ歯根膜組織から分離した細胞をヒト telomerase 遺伝子の導入により不死化した異なる形質を有する培養細胞株 (TesPDL cell) を確立した。これら3つのミニブタ由来歯根膜細胞株 TesPDL-3, 11, 12 を用い、可溶化処理しサイズ制御したカーボンナノチューブならびにファイバーが、細胞増殖活性ならびに細胞機能にどのような影響を及ぼすか調べた。細胞増殖活性ならびにアルカリフォスファターゼ活性は、細胞によってカーボンナノチューブならびにファイバーのサイズならびに添加量により異なっていた。これらの結果から、カーボンナノチューブ・ファイバーの細胞に対する作用には細胞特異性があることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

衣斐美歩, 和田悟史, 佐藤義倫, 田路和幸, 山本松男, 張桂霞, 中島愛子, 和泉雄一, 高尾尊身, 飯田順一郎, 横山敦郎, 田村正人  
サイズ制御したカーボンナノチューブならびにファイバーの歯根膜細胞における細胞増殖と機能に及ぼす影響

「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5回研究成果発表会, 仙台・秋保 (宮城)

2004年9月15日

衣斐美歩, 和田悟史, 佐藤義倫, 田路和幸, 山本松男, 張桂霞, 中島愛子, 和泉雄一, 高尾尊身, 飯田順一郎, 横山敦郎, 田村正人  
形質の異なった株化歯根膜細胞におけるカーボンナノチューブならびにファイバーの細胞増殖と機能に対する作用

「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6回研究成果発表会，岐阜・下呂（岐阜）  
，2005年2月15日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

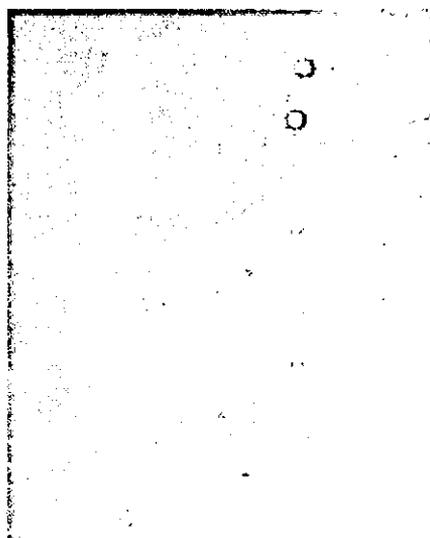


図1 歯根膜組織片からの細胞の out growth

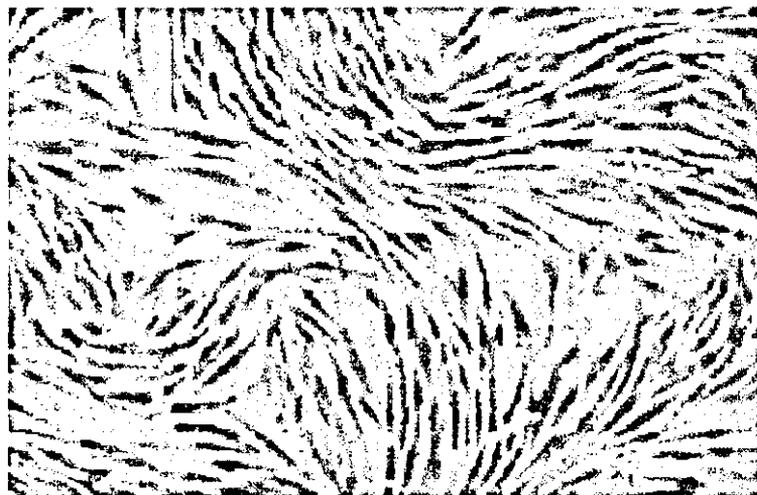


図2 TesPDL11 細胞

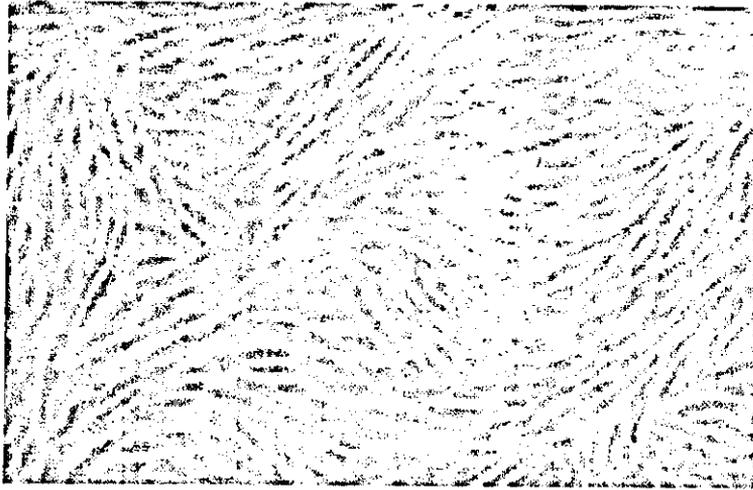


図3 TesPDL12細胞

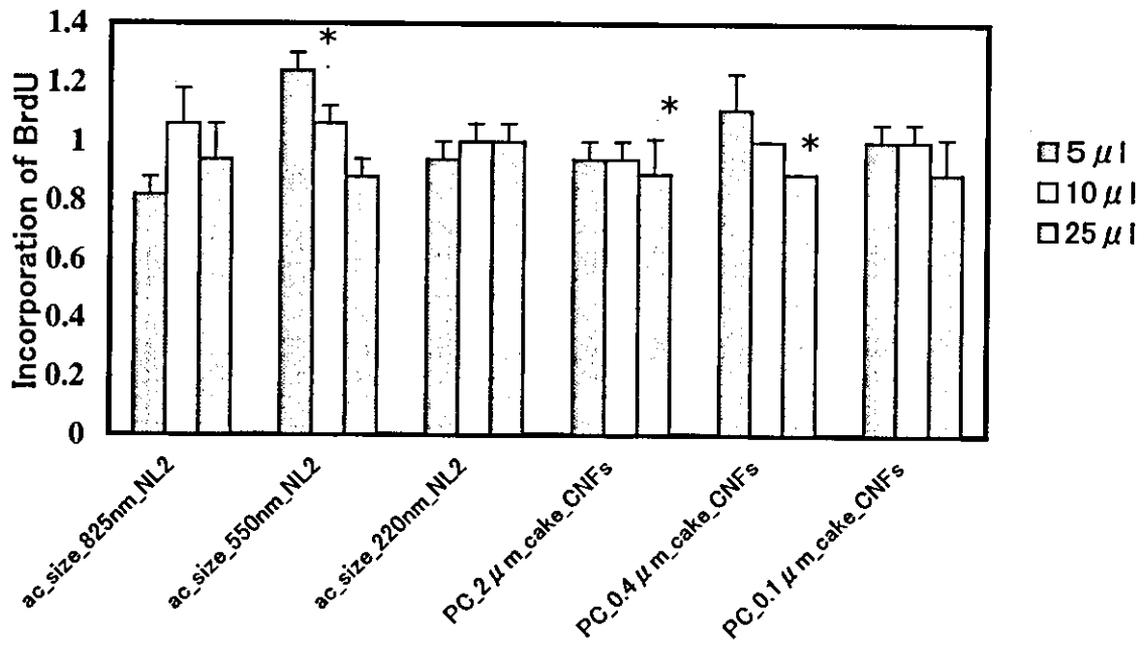
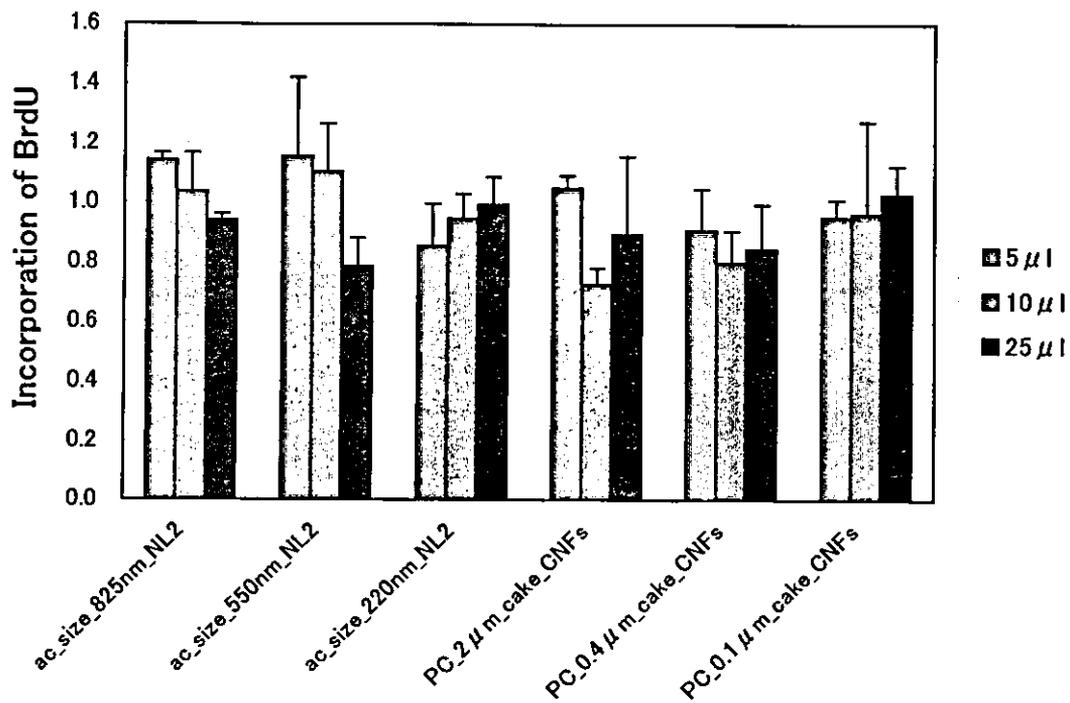
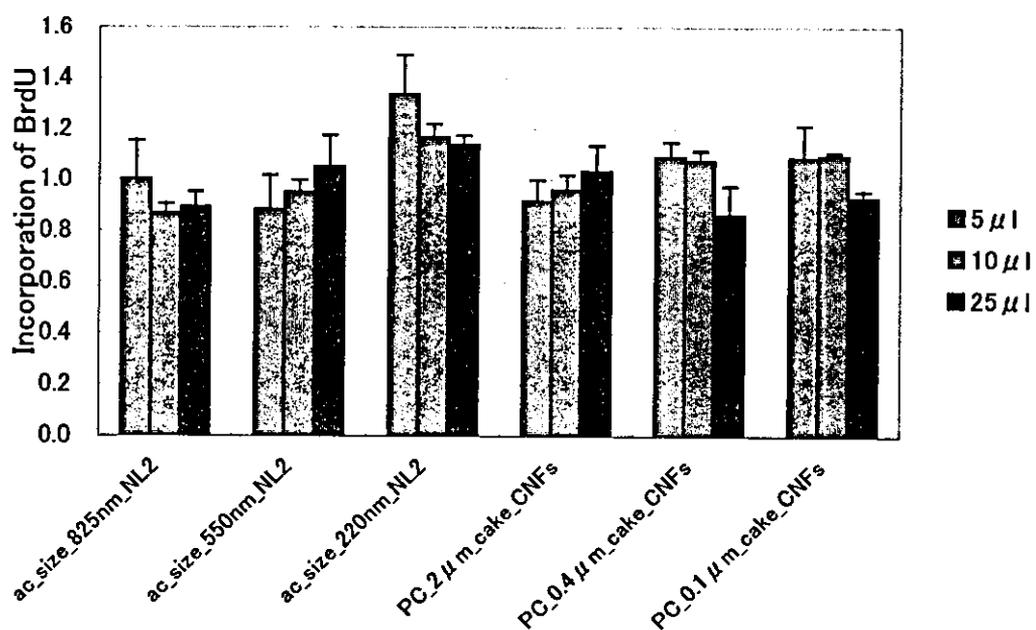


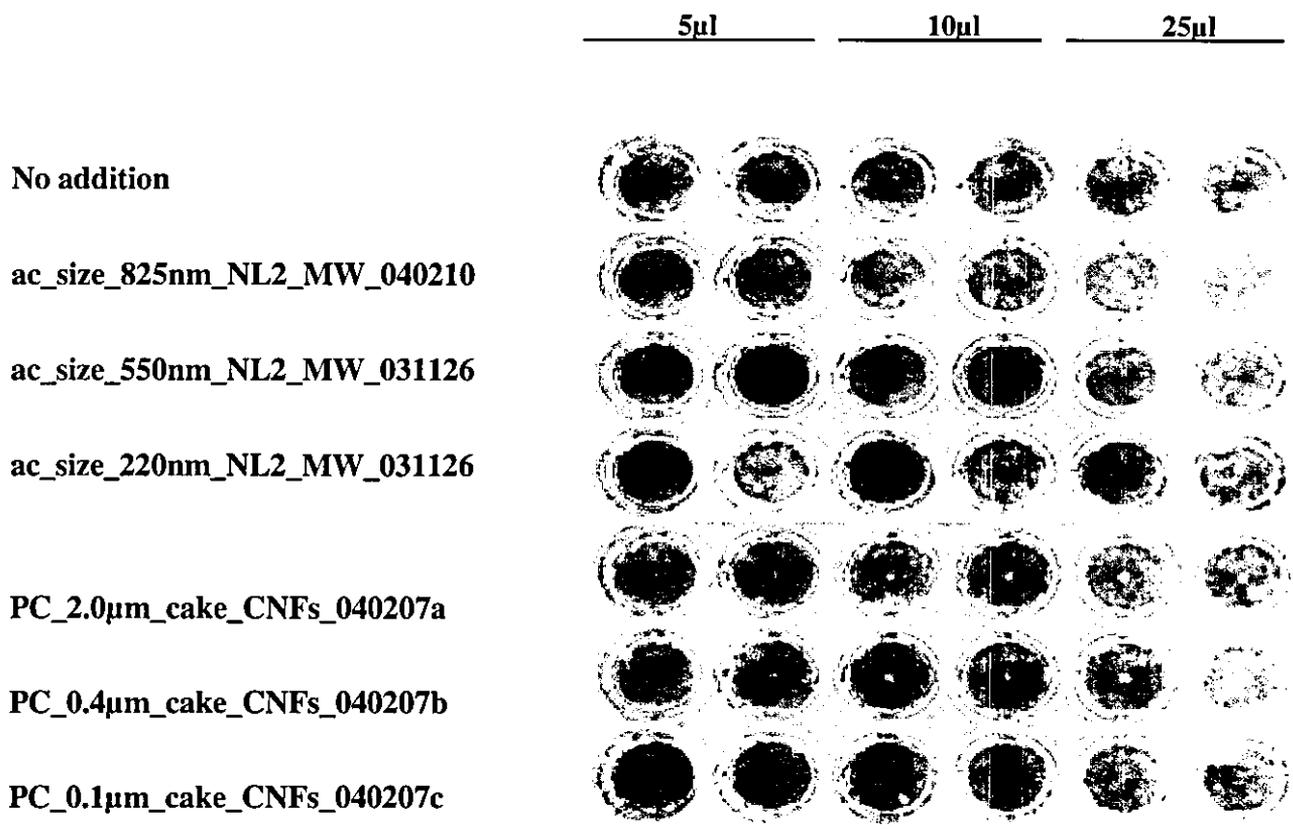
図4 Effects of carbon NT or NF on DNA synthesis in TeSPDL-3 cells



☒ 5 Effects of carbon NT or NF on DNA synthesis in TesPDL-11 cells



☒ 6 Effects of carbon NT or NF on DNA synthesis in TesPDL-12 cells



☒ 7 Effects of carbon NT or NF on alkaline phosphatase (ALP) activities TeSPDL-3 cells

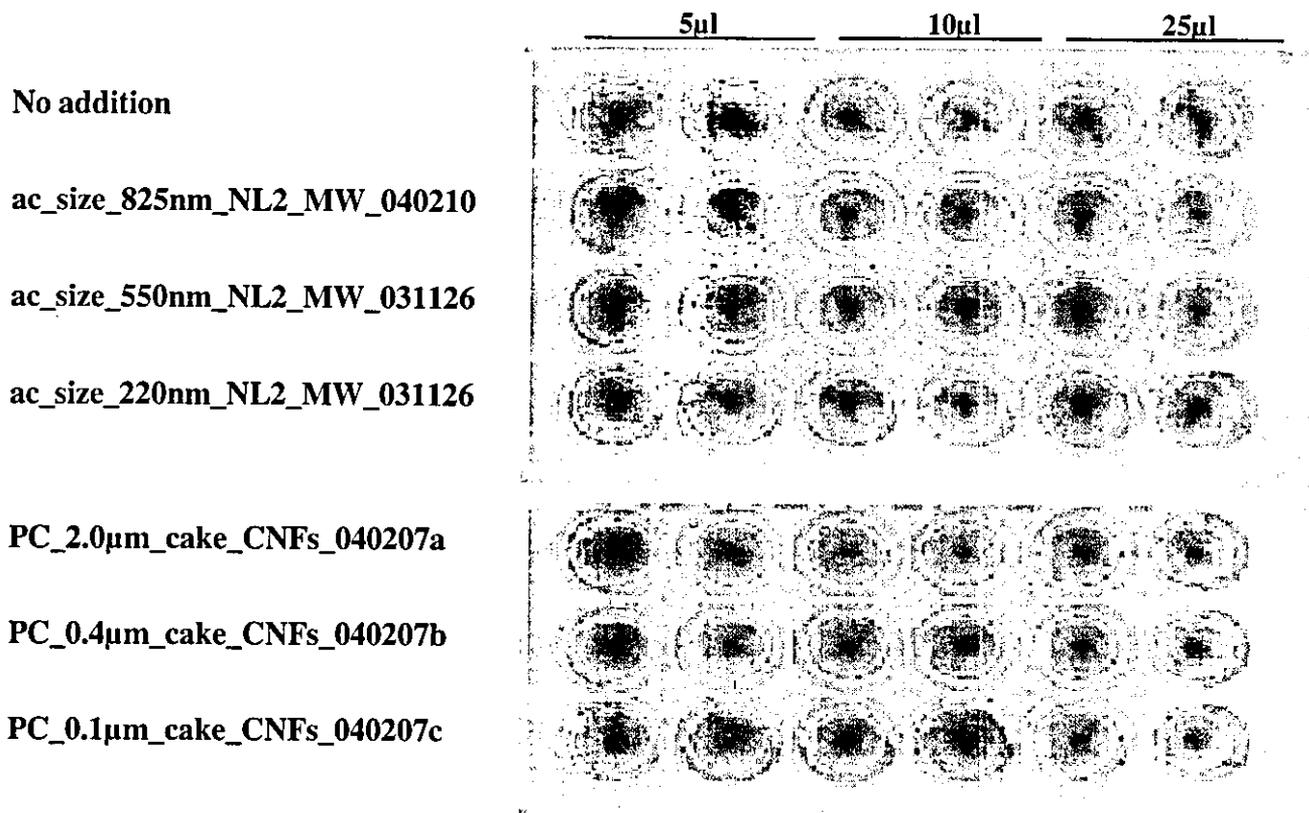


图 8 Effects of carbon NT or NF on alkaline phosphatase (ALP) activities TeSPDL-11 cells

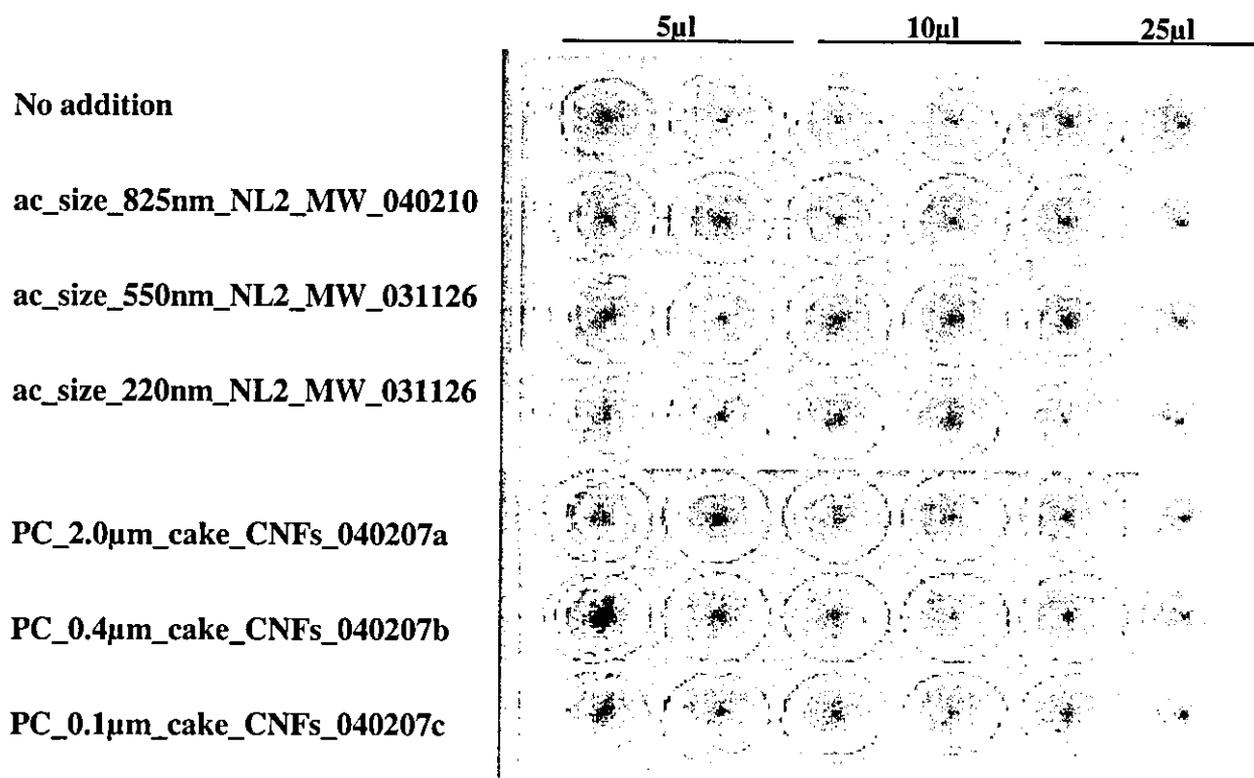


图 9 Effects of carbon NT or NF on alkaline phosphatase (ALP) activities TeSPDL-12 cells

## リポソームへのカーボンナノチューブ組み込みに関する基礎的研究

主任研究者	亘理 文夫	北海道大学大学院歯学研究科	教授
研究協力者	木村 邦衛	北海道大学大学院歯学研究科	大学院生
研究協力者	渋谷 真希子	北海道大学大学院歯学研究科	大学院生
研究協力者	平沖 敏文	北海道大学大学院工学研究科	助教授
研究協力者	野田坂 佳伸	北海道大学大学院歯学研究科	助手
研究協力者	宇尾 基弘	北海道大学大学院歯学研究科	助教授
研究協力者	福島 和昭	北海道大学大学院歯学研究科	教授
研究協力者	鈴木 邦明	北海道大学大学院歯学研究科	教授

カーボンナノチューブ (CNT) およびカーボンナノファイバー (CNF) の生体膜に対する作用を調べるモデルを作成すること、およびリポソームの物理的、あるいは化学的性質を改善するための基礎データを得ることを目的に、CNTあるいはCNFと2種類のスピラベル剤をそれぞれ組み込んだリポソームを作成し、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを測定することによってリポソームの物性に対するCNTおよびCNFの作用を評価した。また、粒度分布測定装置、あるいは電子顕微鏡を用いてリポソーム、CNTおよびCNFの大きさを測定し形状を観察した。電子顕微鏡写真で観察された単独のCNTおよびCNFの長さはいずれも1~2  $\mu\text{m}$ 程度であった。CNTあるいはCNFを添加したESRスペクトルの線形や計算されるパラメーター値は非添加群と顕著な差はなく、周囲にCNTあるいはCNFが存在してもESRスペクトルの測定から推定されるリポソーム膜の流動性には変化が無いことが示された。

### A. 研究目的

リポソームは生体膜のモデルとして繁用され生体膜及び膜タンパク質の機能の解明に大きく貢献し、最近ではドラッグデリバリーシステムの担体としても注目されている。我々は、全身麻酔薬の生体膜に対する作用モデルとしてリポソームおよび細胞膜タンパク質を組み込んだリポソームを作成し、そのリポソームをスピラベルした、ラベル剤の電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを測定することによって、生体膜及び膜タンパク質に対する全身麻酔薬の作用を推定する研究を進めてきた。その経験をもとに、生体膜へのカーボンナノチューブ (CNT) およびカーボンナノファイバー (CNF) の作用を調べるモデルを作成すること、およびリポソームの物理的、あるいは化学的性質を改善するための基礎データを得ることを目的と

して、リポソームへのCNTおよびCNFの組み込みを試みた。リポソームの物性に対するCNTおよびCNFの作用を評価する方法として、今回はラベル剤のESRスペクトルから計算されるオーダーパラメーターと回転相関時間を基に膜の流動性の変化を推定した。また、電子顕微鏡によりリポソーム、CNTおよびCNFの形状を観察した。

### B. 研究方法

リポソームを形成するリン脂質には卵黄由来のホスファチジルコリン (EYPC) を、スピラベル剤には5-doxyl stearic acid (5-DSA)、および16-doxyl stearic acid (16-DSA) を使用した。可溶性CNTとしてacid\_cut\_NL2\_MW\_031003 (acid-cut NL2) およびET\_ozon\_cut\_NL2\_MW\_031003 (ET ozon-cut

NL2)を、CNFは acid\_cut\_CNF\_031003 (acid-cut CNF) を使用した。

リポソームは2種類作成した。一つは5-DSAあるいは16-DSAを組み込んだ多重層リポソーム (MLV) にさらにCNTおよびCNFを添加したMLV懸濁液であり、もう一つは16-DSAを組み込んだ大きな1枚膜リポソーム (LUV) にCNTを添加したLUV懸濁液である。これらリポソームを用いてESRスペクトルを測定しオーダーパラメーター(S)と回転相関時間( $\tau$ )を計算した。

CNTとCNF、およびこれらを組み込んだMLVあるいはLUV懸濁液をネガティブ染色して、日立H-800透過型電子顕微鏡を用いて観察した。また、作成したリポソームの大きさを、島津SALD-7000粒度分布測定装置を用いて測定した。

### C. 研究結果

1) 粒度分布測定装置を使用して測定したMLVの大きさは3から50 $\mu$ mに分布し、20から40 $\mu$ mが最も多かった (Fig. 1)。電子顕微鏡写真で観察された単独のCNTおよびCNFの長さは、acid-cut CNF、acid-cut NL2およびET ozon-cut NL2いずれも1~2 $\mu$ m程度であった (Figs. 2-5)。

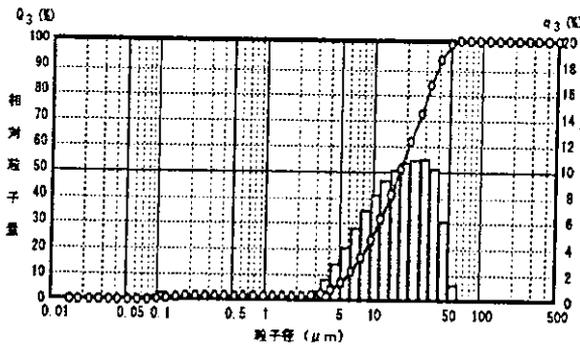


Fig. 1 粒度分布測定 (MLV)



Fig. 2 acid\_cut\_NL2\_MW\_031003



Fig. 3 ET\_ozon\_cut\_NL2\_MW\_031003



Fig. 4 acid\_cut\_CNF\_031003



Fig. 5 acid\_cut\_CNF\_031003

2) CNTおよびCNFを添加したMLV懸濁液の5-DSAおよび16-DSAのESRスペクトルの線形は、CNTおよびCNF非添加のものと比較して差は見られなかった (Figs. 6, 7)。そのスペクトルから計算されたSおよび $\tau$ においても非添加のものとはほとんど差がなかった (Table 1)。電子顕微鏡により、多重層のMLVが観察されその粒径は40~150 nm程度であった (Fig. 8)。電子顕微鏡による観察ではリポソームよりCNTおよびCNFのほうが大きいと考えられるが、今回はCNTおよびCNFとリポソームの立体配置と大きさの関係を直接推定できる像を得ることが出来なかった。

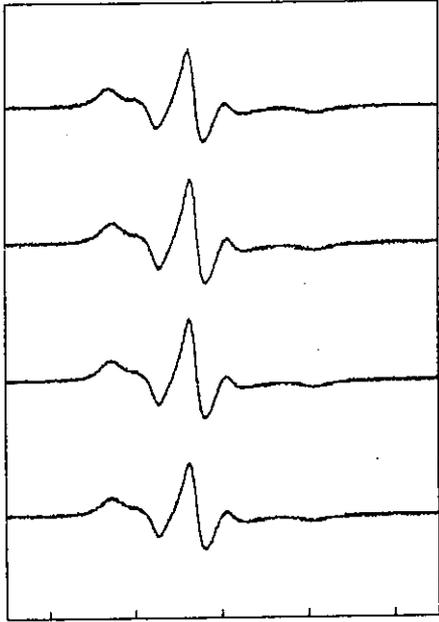


Fig. 6 EYPC (MLV)に組み込まれた5-DSAのESRスペクトル(上から control, acid cut NL2, ET ozon cut NL2, acid cut CNF)

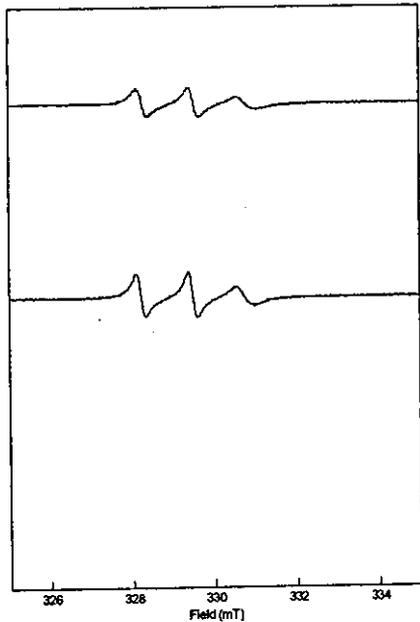


Fig. 7 EYPC (MLV)に組み込まれた16-DSAのESRスペクトル(上から acid cut CNF 0.1 mg/ml, acid cut CNF 0.2 mg/ml) (右)

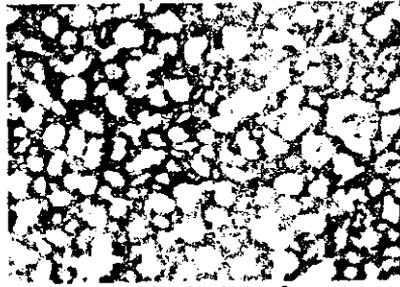


Fig. 8 多重層リボソーム (MLV)

3) MLVは内腔が非常に狭かったため、内腔が大きいことが予想されるLUVを作成し16-DSAとCNTを組み込んだ。粒度分布測定装置を使用して測定したLUVの大きさは0.2から20 $\mu\text{m}$ に分布し、1.5から15 $\mu\text{m}$ が最も多かった (Fig. 9)。CNTを添加したLUV懸濁液のESRスペクトルも非添加のもの比べて線形にはほとんど差がなく (Fig. 10)、そのスペクトルから計算したSおよび $\tau$ も非添加のもの比べて顕著な差は認められなかった (Table 1)。電子顕微鏡による観察では200~600 nm程度の大きさでMLVに比べて内腔の大きなりポソームが観察されたが (Fig. 11)、CNTとリポソームの立体配置と大きさの関係を直接推定できる像を得ることは出来なかった。

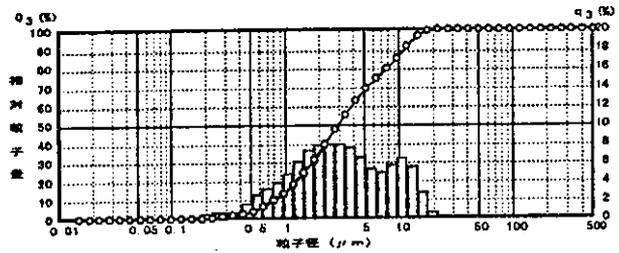


Fig. 9 粒度分布測定 (LUV)

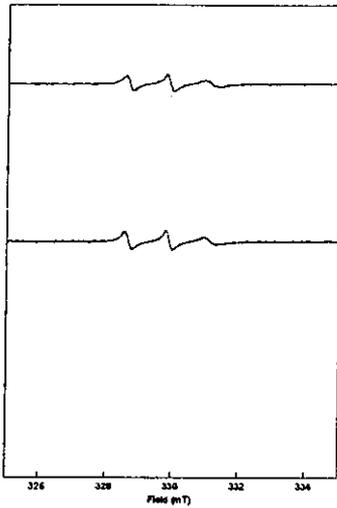


Fig. 10 EYPC(LUV)に組み込まれた16-DSAのESRスペクトル(上から acid cut NL2, ET ozon cut)

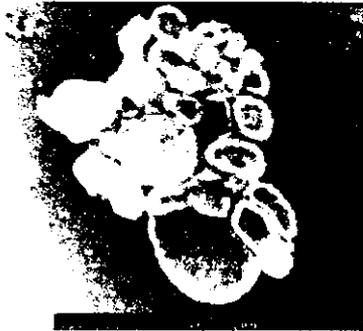


Fig. 11 大きな1枚膜リポソーム (LUV)

Sample	S	$\tau$ (psec)
5-DSA+PC コントロール	0.68	
5-DSA+PC+acid cutNL2 0.01mg/ml	0.69	
5-DSA+PC+ET ozon cut NL2 0.01mg/ml	0.68	
5-DSA+PC+acid cut CNF 0.01mg/ml	0.69	
16-DSA+PC コントロール	0.14	42
16-DSA+MLV+acid cut CNF0.1mg/ml	0.16	38
16-DSA+MLV+acid cut CNF0.2mg/ml	0.14	41
16-DSA+MLV+acid cut CNF0.2mg/ml 1回目 (相分離前)	0.13	40
16-DSA+MLV+acidcut	0.14	42

CNF0.2mg/ml 2回目 (相分離後)		
16-DSA+MLV+acid cut CNF0.2mg/ml 3回目 (相分離後)	0.12	41
16-DSA+LUV+acid cut NL2 0.1 $\mu$ g/ml	0.12	36
16-DSA+LUV+ET ozon cut NL2 0.1 $\mu$ g/ml	0.11	37

Table.1 測定した ESR スペクトルの S および  $\tau$

4) リポソームを用いた ESR 測定中に、高濃度の CNF を添加したサンプルで相分離が起こり、分離したものでは ESR スペクトル強度が増大する現象が観察された。

#### D. 考察

CNT および CNF を添加した MLV 懸濁液と LUV 懸濁液の 5-DSA および 16-DSA における ESR スペクトルの線形変化や、スペクトルから計算された S および  $\tau$  の値が非添加のものに比べ顕著な差が無かったことから、今回の条件下では CNT および CNF とも、リポソーム膜の流動性には変化を与えないことを示した。

また、高濃度の CNF を添加したサンプルで相分離が生じた原因として、ESR 測定時のマイクロ波の電場成分が電導体である CNF に影響を与えた可能性があるかと推定しているが、さらに検討を加えたい。

#### E. 結論

現在までの結果では周囲に CNT あるいは CNF が存在しても ESR スペクトルの測定から推定されるリポソーム膜の流動性には変化が見られなかった。しかし、CNT あるいは CNF とリポソームの立体配置が明かなリポソームを作成してその効果を調べることが必要であり、今後、種々条件を変えたリポソームを作成して CNT あるいは CNF の存在によるリポソーム膜の物性の変化を調べる予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 渋谷真希子、平沖敏文、木村邦衛、堤 耀廣、鈴木邦明、福島和昭、リポソーム中に存在するスピララベル剤の ESR スペクトルと全身麻酔薬の影響、北海道歯学会雑誌、25 巻 1 号、68-76、2004

2) 木村邦衛、平沖敏文、渋谷真希子、福島和昭、鈴木邦明、リポソーム中のスピララベル剤の周辺環境に及ぼす吸入麻酔薬の影響とその温度依存性、北海道歯学会雑誌、25 巻 2 号、346-355、2004

3) 木村邦衛、平沖敏文、渋谷真希子、福島和昭、鈴木邦明、リポソーム中のスピララベル剤の周辺環境に及ぼすホスファチジルコリンの種類と温度の影響、北海道歯学会雑誌、25 巻 2 号、356-367、2004

### 2. 学会発表

1) ○木村邦衛、渋谷真希子、平沖敏文、野田坂佳伸、古月文志、宇尾基弘、赤坂 司、佐藤義倫、田路和幸、福島和昭、亘理文夫、鈴木邦明：リポソームへのカーボンナノチューブ組み込みに関する基礎的研究、平成 16 年冬期第 6 回研究成果発表会(岐阜、2005 年 2 月)。(抄) 同講演予稿集、75-79、2005

2) ○渋谷真希子、鈴木邦明、木村邦衛、平沖敏文、福島和昭：脂質様スピララベル剤の ESR スペクトルと全身麻酔薬がおよぼす影響、第 84 回北海道医学大会(札幌、2004 年 9 月)。(抄) 同講演予稿集、22、2005.

3) ○木村邦衛、平沖敏文、渋谷真希子、鈴木邦明、福島和昭：リン脂質二重膜に対する吸入麻酔薬の作用の温度依存性- 電子スピン共鳴 (ESR) を用いた研究-、第 32 回日本歯科麻酔学会総会(東京、2004 年 10 月)。(抄) 日本歯科麻酔学会雑誌、32 巻 4 号：564 (2004)。

4) ○渋谷真希子、鈴木邦明、木村邦衛、平沖敏文、福島和昭：リポソーム中に存在するスピララベル剤の ESR スペクトルと全身麻酔薬の影響、第 32 回日本歯科麻酔学会総会(東京、2004 年 10 月)。(抄) 日

本歯科麻酔学会雑誌、32 巻 4 号：564 (2004)。

5) ○渋谷真希子、鈴木邦明、平沖敏文、木村邦衛、堤 耀廣、福島和昭：全身麻酔薬がたんぱく質および脂質に及ぼす影響の電子スピン共鳴法による解析、第 20 回日本歯科医学学会総会(神奈川、2004 年 10 月)。(抄) 日本歯科医師会雑誌、57 巻 4 号、394、2004

6) ○渋谷真希子：全身麻酔薬がモデル生体膜におよぼす影響の電子スピン共鳴法による解析、平成 16 年度北海道歯学会秋季学術大会(札幌、2004 年 11 月)。(抄) 北海道歯学会雑誌、25 巻 2 号、346-355、2004

7) 渋谷真希子、平沖敏文、木村邦衛、吉村善隆、出山義昭、福島和昭、○鈴木邦明：リポソーム中の異なった位置にラベルされたスピララベル剤の ESR スペクトルに対する全身麻酔薬の影響、第 78 回日本薬理学会総会(神奈川、2005 年 3 月)。

8) 木村邦衛、平沖敏文、渋谷真希子、吉村善隆、出山義昭、福島和昭、○鈴木邦明：リポソーム中のスピララベル剤に及ぼす吸入麻酔薬の影響とその温度依存性、第 78 回日本薬理学会総会(神奈川、2005 年 3 月)。

分担研究報告書

協力研究者 古月 文志 北海道大学大学院地球環境科学研究科助教授

研究要旨 カーボンナノチューブ（CNT）に代表される炭素素材とアルギン酸などの有機素材を融合することによって新たな機能が生まれる。汚染物質の検出や捕集、濃縮のために、炭素素材と有機素材を融合させた新規の材料開発が進められている。CNT を内包したアルギン酸ゲルによる選択的捕集が行われ、新規な環境修復材料が開発されている。

A. 研究目的

現在地球上には温暖化やオゾン層の破壊、酸性雨や汚染物質の拡散など多くの環境問題が存在する。これらの問題の解決のためには原因物質の排出を抑制し環境負荷を低減するための科学技術の展開が不可欠であり、省エネやクリーンエネルギー、環境にやさしい商品や新素材の開発など、いわゆるグリーンケミストリーの研究が精力的に行われている。一方で、既に汚染されてしまった環境が地球上には多数存在する。それらを放置すれば汚染は広がるばかりであり、汚染された環境から汚染物質を除去し元の安全な状態に戻すための環境修復法の開発も同時に進められなければならない。環境には汚染物質の他に多くの、そして汚染物質よりもはるかに高濃度の共存物質を含んでいる。これらの中から汚染物質だけを除去することは至難の業である。また、現在多くの汚染物質の処理法が開発されているが、それらの多くは、高濃度の汚染物質を対象としたものであり、低濃度の汚染物質の処理に適用するには非効率的である。そこで、複雑な環境物質から選択的に汚染物質を捕集し、既存の処理法が適用できる濃度まで濃縮することのできる新規な材

料・方法の開発が今求められている。

炭素素材は古くから様々な分野で用いられてきた。木炭は脱臭剤や汚染物質の吸着剤として、黒鉛はその伝導性を生かして各種の電極として、またダイヤモンドはその硬さを利用してカッターや研磨剤として利用されてきた。さらに近年炭素の中にフラーレンやカーボンナノチューブ（CNT）、カーボンファイバー等特殊な構造と機能を有するものが見出され、その特性を最大限使用しうる「場」の探索が盛んに行われている。今回は、バイオ及び環境分野におけるカーボンナノチューブの展開について、特に汚染物質の捕集・除去への利用に関する研究を行った結果について報告する。

B. 研究方法

CNT は、環境中や生体内に侵入・蓄積された有害物質を除去するための新たな吸着剤となりうる。ナノカーボン材料を環境の浄化・修復に用いる時、吸着サイトの保護や、汚染物質が吸着した CNT を処理水と分離する際の簡便さのために、CNT を包み込む処理をする必要がある。すなわち、1.2%（重量比）のアルギン酸ナトリウムの水溶液に CNT を加え、ホモジナイザーと

超音波で十分に混合させる。このアルギン酸ナトリウム/CNT コロイド溶液を図-1に示すカプセル封入装置を用いて、CNT 内包型のアルギン酸ビーズに加工する。このシステムはノズルの振動システムと液滴表面への電荷の注入による静電的な反発により、図-2に示すように微小のゲルビーズを安定に作製することができる。

### C. 研究結果

図-3は陰イオン性の色素であるエオシン-Bを水から除去する実験の結果を示す。CNTを内包したビーズが $0.33 \mu\text{mol}/\text{mg}$ の除去力(吸着容量)を示したことに對して、CNTを内包したビーズ及び活性炭を内包したビーズがそれぞれ $0.06 \mu\text{mol}/\text{mg}$ と $0.19 \mu\text{mol}/\text{mg}$ の値を示した。つまり、吸着剤の除去力はCNT内包ビーズ > 活性炭型内包ビーズ > カーボンナノファイバー内包ビーズの順であった。一方、陽イオン性の化合物(例えば、アクリジンオレンジ)に対する除去力は、CNTを内包したビーズ及びカーボンナノファイバーを内包したビーズはどちらも、活性炭を内包したビーズと比べ高い値を示した。前述の通りCNTの表面構造は、カーボンナノファイバーや活性炭の表面構造と本質的に異なり筒状に丸まったグラフェンシート構造であるため、疎水性の高い化合物、特に本研究で用いたベンゼン環を持った物質と強く結合する性質を持っている。その結果、対象物質は強い親和力でCNTに保持され、除去されることになる。

### D. 考察

アルギン酸ゲルで包摂したCNTの吸着剤としての特徴を、図-4のようなイラストによって以下のようにまとめることができる。CNTを内包

したアルギン酸ゲルは、ベンゼン環を持つ有害物質を選択的に吸着・除去することのできる複合型の環境浄化剤である。アルギン酸ゲルは、「網」のような性質を持ち、吸着サイトであるCNTを固定するとともに、これらの吸着サイトをコロイドや腐植酸類などのようなサイズの大きい物質から守る役割を果たしている。アルギン酸ネット内に拡散することの出来る物質の中で、CNTと強く結合するものが、ゲル内に保持され除去される。CNTと作用しない物質あるいは結合しない物質、例えば、水や無機電解質などはCNTに保持されずに、ピース(吸着剤)を通過する。

### E. 結論

アルギン酸ゲルで包摂したCNTは生体親和性が高く、生体内に侵入・存在する有害物質の除去にも使えるのではないかと期待されている

### F. 健康危険情報

現時点で本研究において扱っている物質、ならびに実験の結果得られた新物質に関し、特に健康を害する危険な結果ならびに兆候に関する知見は得られていない。

### G. 研究発表 論文発表

1. B. Fugetsu, S. Satoh, A. Iles, K. Tanaka, N. Nishi, F. Watari, *The Analyst (London)*, **129**, 565 (2004).
2. B. Fugetsu, S. Satoh, T. Shiba, T. Mizutani, Y. Nodasaka, K. Yamazaki, K. Shimizu, M. Shindoh, K. Shibata, N. Nishi, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77**, 1945 (2004).
3. B. Fugetsu, S. Satoh, T. Shiba, T. Mizutani, Y.-B. Lin, N. Terui, Y.

- Nodasaka, K. Sasa, K. Shimizu, T. Akaraka,  
M. Shindoh, K. Shibata, A. Yokoyama, M.  
Mori, K. Tanaka, Y. Sato, K. Tohji, S.  
Tanaka, N. Nishi, F. Watari, Environ. Sci.  
& Technol., 38, 6890-6896 (2004).
4. S. Satoh, B. Fugetsu, M. Nomizu, N. Nishi,  
Polymer J., 37, 94-101 (2005).

学会発表

- I. 生体に優しい可溶化カーボンナノチューブ、古月、佐藤、野田坂、柴、進藤、西、亘理、  
第26回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、平成16年1月、岡崎
- II. 知的財産権の出願・登録状況  
特許出願 特になし

図-1 CNT をアルギン酸ゲルに封入する際に使用した装置の模式図

装置は、シリンジポンプ (A)、振動チャンバー (B)、振動システム (C, D)、同心ノズル (F)、0-型電極と静電気発生システム (G, E)、架橋イオン溶液 (H)、及びマグネット回転子 (I) から構成されている。

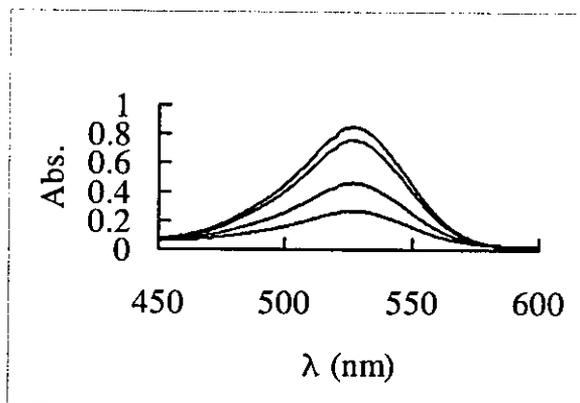
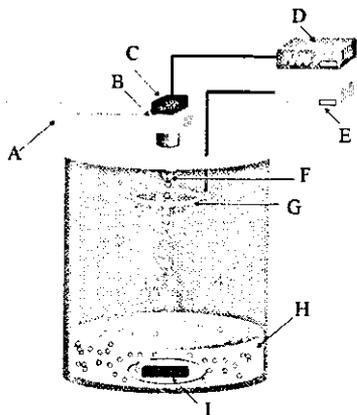


図-3 エオシン-B を吸着・除去する実験結果  
除去処理前の原液 (10.0 μM)、カーボンナノファイバー内包ビーズ、活性炭内包ビーズ、及び多層CNT内包ビーズ (上から下への順) で処理した後の水溶液の吸収スペクトル。処理に用いた各種のビーズの量は 3.0 ml;、処理に用いたエオシン-B 原液の体積は 15 ml。

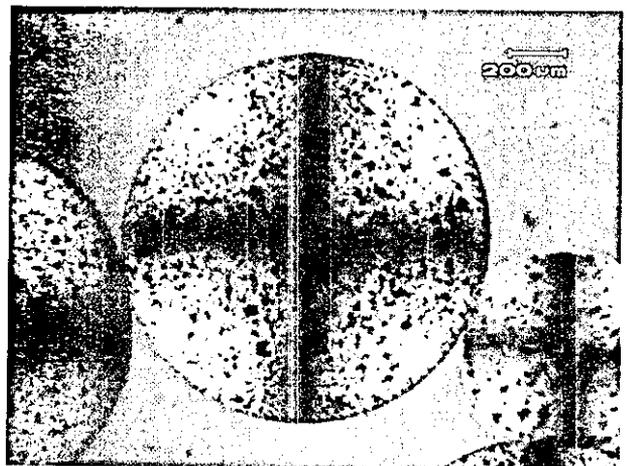


図-2 多層CNTをアルギン酸ゲルに封入した状態の顕微鏡写真用いた CNT/アルギン酸ナトリウム混合コロイドの濃度は、多層CNTが 100ppm であり、アルギン酸ナトリウムが 1.2% である。

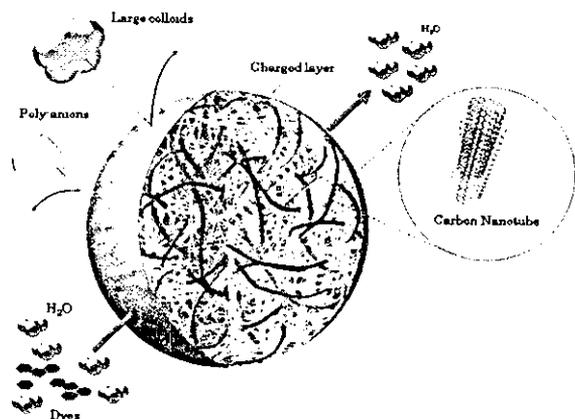


図-4 CNT 内包アルギン酸ゲルの構造と機能  
CNT は吸着サイトとして機能する一方、アルギン酸ゲルは、吸着サイトの固定、保護用の「網」として機能する。