

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

X線を用いたナノクラスターキャラクタリゼーション手法の開発研究

分担研究者 亘理文夫 北海道大学歯学研究科教授  
研究協力者 朝倉清高 北海道大学触媒化学研究センター教授

X線を用いたナノレベル分析手法の開発に取り組むとともに、ナノチューブ中の不純物の構造を調べた。EXPEEMと呼ばれる新しいタイプの電子顕微鏡であり、ナノ領域の化学分析を可能にする。また、最後に新しい顕微分光法であるXANAMについても述べる。

#### A. 研究目的

ナノチューブ、ナノ微粒子の生体適合性を調べ、DDSや組織代替材料に応用するためには、こうした微粒子の構造を生体環境またはそれに近い環境で調べる必要がある。この目的を達成するためには、透過力の大きな光であるX線が有効である。X線は内殻の電子を励起できるだけの十分なエネルギーを持つ光である。内殻電子は元素固有の束縛エネルギーで原子に結合しているため、X線の波長を掃引したり、飛び出してきた光電子の運動エネルギーを調べることで、元素の種類を特定し、その電子状態や周辺構造を調べることができる。こうした手法を用いてナノ粒子の構造解析やナノ領域の化学反応を追跡するための以下の3手法開発に取り組んでいる。

#### B1. 研究方法 XAFS法によるナノチューブ中の金属触媒の構造解析

X線のエネルギーを掃引して、その吸収スペクトルを測定すると、図1に示すように、特定のエネルギー位置でX線吸収係数が急激に増大する吸収端が現れる。この吸収端より高エネルギー側に現れる振動構造がXAFS

(X-ray Absorption Fine Structure) と呼ばれるものである。この振動構造は、光電子として放出された内殻光電子が周辺原子により散乱され、干渉しあうことで現れる。この振動構

造をフーリエ変換すると、動径分布関数に対応するものを与え、周辺原子までの結合距離や周辺原子の種類や配位数を決定することができる。我々は、カーボンナノロッドおよびチューブ中に存在する金属触媒の構造をこの手法で調べた。

実験は高エネルギー物理学研究機構放射光実験施設BL9Aにおいて行った。X線の波長掃引は、Si(111)2結晶モノクロメータによりおこなない、X線の検出は、電離箱（透過法）あるいはGe半導体検出器（蛍光法）を用いて行った。

その結果、金属未除去のカーボンナノロッド中に存在するNi触媒については、図2に示すような動径分布関数が得られた。解析の結果、ピークはNi-Ni結合に対応し、その結合距離0.248 nmであり、金属微粒子として存在することが分かった。また、配位数を解析すると、バルクNiと同じ配位数であったことから、10nmを越える比較的大きな金属微粒子で存在していることがわかった。さらに、Ni除去処理後については、蛍光法により測定した。蛍光強度より、Niの存在量は約100ppm程度であると推定された。Ni-Ni結合に対応するピークがわずかに観測される他、Ni-Cのピークが観測された。残存したNiは、Cと強く結合しているものと考えられる。多重散乱法による吸収端付近のスペクトル（図4）の解析から、図

5に示すようなNi dダイマー構造で、CNTに固定されていることがわかった。

#### D1. 考察

EXAFSは100ppmという微量な条件においても金属の構造を調べることができる。得られる情報は、金属の存在状態である。今回カーボンナノロッド中の金属の構造を調べたが、実際に生体に応用する場合は、金属を除去することになる。金属除去後の構造として、カーボンと強く結びついた状態で存在しており、カーボンナノロッドに強く結びつくことから、体内に長く残存し、蓄積される危険性がある。

#### E1. 結論

XAFSは、微量金属の構造を原子レベルで調べることができ、カーボンナノロッド中に微量に残存するNiはダイマー構造をなし、ナノロッドと強く結びついた状態で存在することがわかった。これは、体内に長く残り、蓄積する可能性がある。

#### B2. 実験方法—EXPEEM法の開発

EXPEEM(energy filtered X-ray photoemission electron microscopy)法は、ミクロンからナノの領域における元素分析能をもち、非破壊性も高いという特徴を有する。さらに、ガス共存下でのin-situ分析も可能である。われわれは、光軸が直線上になるWien filterをエネルギー分析器として持つEXPEEM装置を開発した。(図6) Wien filter中では、電場Eと磁場Bを直交して存在する空間をもつ。この空間を電子が走ると、電場と磁場からお互いに反対向きの力を受ける。磁場から受けるローレンツ力は、電子の速度に比例することから、特定の運動エネルギーを持つものだけが直進する。この直進した電子を選別することで、電子の運動エネルギー分析し、表面の化学マッピングが可能となる。

#### C2. 実験結果

放射光を用いて、我々は、Au/Taの元素分解能を1-2 $\mu$ mという空間分解能をもつ光電子放出顕微鏡像を高エネルギーX線領域ではじめて測定することができた。図7に光電子の運動エネルギーを分析したEXPEEM像を示す。0-90 eVの運動エネルギーで結像するとほぼ、Au領域が明るい。これは、Au領域から放出される光電子が多いためである。一方Ta3p<sub>5/2</sub>のピークを用いて結像した場合Ta領域の方が明るくなる。

#### D2. 考察

これまで、Wien filterを用いたEXPEEMは感度が

小さく、実用化は難しいと考えてきたが、本研究によりその可能性が示された。現在さらに、Wien filterの高感度化の取り組みを続けている。その結果、図8に示すようなEXPEEM像を実験室系のX線源で取得できるようになった。

#### E2. 結論

X線を用いたnmオーダーの元素マッピングを可能とするEXPEEM法を開発した。より高い感度に成功した。

#### B3. 実験方法—XANAM法の開発

NC-AFM法は、表面の原子分解能像を与える手法であり、ポリマーや絶縁体にも適応可能な手法である。ところが、表面の元素の分布に関しては、通常得ることが難しい。元素分析能を得るためには、表面との相互作用が変化することが必要である。表面との主な相互作用の要因として、最近表面とNC-AFMチップ先端の共有結合力が重要な役割を果たすと言われている。化学結合は、HOMOとLUMOが関与するものであり、これらの軌道の電子密度を元素や化学状態にしたがって外部から制御できれば、原子間力を元素や化学状態ごとに人為的に変化させ、元素分析、化学分析能を非接触原子間力顕微鏡に持たせることができると考えられる。すなわち波長可変X線を用いて、元素固有の結合エネルギーを持つ内殻電子をLUMOへ励起することで、元素や化学状態に応じて、原子間力を制御できる可能性がある。この原理の妥当性をしらべるため、Si基板上にAu薄膜を蒸着し、X線を照射しながら、力の定数の変化を調べた。

#### C3. 結果

その結果、図9 Au薄膜上にNCAFM探針先端をおいたときのみ、Au L3吸収端と同じエネルギーをもつX線により、原子間力が変化を示した。また、Auの存在しないSi表面上では、X線に対して、力の定数の変化がない。

#### D3. 考察

以上の結果より、X線を併用しながら、NC-AFMを掃引することで、表面元素の原子レベル分布を出ることができると期待される。われわれはこの新手法をXANAM(X-ray aided non-contact atomic force microscopy)と名付けた。

#### F. 健康危険情報

NiがCNTを合成するときに触媒として使わ

れているが、生体適合材料としてCNTを使う場合、微量なNiが残留し、それが強くCNTに固定化されているため、体内に長期間とどまることが予想される。Niがアレルギーであることを考えると、Niを利用した生体適合CNT製造を控え、代替金属(Feなど)に切り替えていく必要がある。

#### G. 研究発表

1. H. Niimi, M. Kato, M. Kudo, T. Kawasaki, W.J. Chun, S. Suzuki and K. Asakura, *Development of imaging energy analyzer using multipole Wien Filter*. Appl.Surf.Sci., 2005. **241**: p. 131.
- 2.. K. Asakura, W.J. Chun, K. Tohji, Y. Sato and F. Watari, *XAFS studies on the local structures of Ni impurities in a CNT*. Chem Lett., 2005. **34**(3): p. 382.
3. T. Naito, T. Inabe, N. Niimi and K. Asakura, *Light induced transformation of molecular materials into devices*. Advanced Materials., 2004. **16**: p. 18.
4. S. Suzuki, Y. Koike, K. Fujikawa, W.-J. Chun, M. Nomura and K. Asakura, *A possibility of XANAM(X-ray Aided Non-contact Atomic Force Microscopy)*. Chem.Lett., 2004. **33**(5): p. 636-637.
5. H. Niimi, T. Tsutsumi, H. Matsudaira, T. Kawasaki, S. Suzuki, W.J. Chun, M. Kato, Y. Kitajima, Y. Iwasawa and K. Asakura, *Recent progresses in an energy filtered high energy XPEEM using a Wien filter type energy analyzer*. Appl.Surf.Sci., 2004. **237**: p. 641-644.
6. H. Yasufuku, Y. Ohminami, T. Tsutsumi, H. Niimi, N. Matsudaira, K. Asakura, M. Kato, Y. Sakai, Y. Kitajima and Y. Iwasawa, *Observation of element specific energy filtered X-ray Photoemission electron microscopy(EXPEEM) images of Au on Ta using a Wien filter type energy*

*analyzer*. Jpn.J.Appl.Phys., 2004. **43**(11): p. 7682-7688.

7. 朝倉清高, *PEEM*, 表面科学の基礎と応用(表面科学会編, NTS) (2004) p 683.
8. K. Asakura, *軟X線(1-3 keV)を用いた内殻励EXPEEMによる表面化学マッピングの可能性について*, PF NEWS, 2004. **21**: p. 28-32.
9. W.J. Chun, K. Ijima, Y. Ohminami, S. Suzuki and K. Asakura, *Theoretical Debye Waller Factors of  $\alpha$ -MoO<sub>3</sub> Estimated by an Equation-of-Motion Method*. J.Synchrotron Rad., 2004. **11**: p. 291-294.
10. K. Ijima, Y. Koike, W.-J. Chun, Y. Satio, Y. Tanizawa, T. Shido, Y. Iwasawa, M. Nomura and K. Asakura, *A local structure of low coverage Ni species on the  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(0001) surface-a polarization Dependent XAFS studies*. Chem,Phys.Lett., 2004. **384**: p. 134-138.
11. Y. Iwasawa, K. Asakura, Y. Sakai and M. Kato, *化学分析用複合放出電6?顕微鏡装置,特許.3533335,(year)*

#### 発表

1. 朝倉清高. *新しい顕微法による化学マッピング法:触媒表面観察の可能性,性研短期研究会*. 2004. (柏).
2. 朝倉清高 鈴木秀士. 新美大伸. *新しい顕微法と触媒表面観察の可能性*. in 日本顕微鏡学会シンポジウム. 2004. (名古屋).
3. 朝倉清高. *Wien filter型EXPEEMの可能性, 24回表面科学講演大会*. 2004. (早稲田大学).
4. 朝倉清高 *放射光を用いたX線顕微分光と触媒化学 EXPEEM法とXANAM法*. JEOL User Group Meeting. 2004.

- (東京) .
- 2004, (京都) .
5. 朝倉清高. EXAFS法による超微粒子構造解析, コロイドおよび界面討論会. 2004 (山口東京理科大学) .
  6. 佐藤慎祐, 新美大伸, 鈴木秀士, 田旺帝, 朝倉清高, 色川勝巳 黒田晴雄. 6 赤外自由電子レーザー により, 誘起される固体表面反応. 第5回黒田シンポジウム. 2004 (東京) .
  7. 朝倉清高, 偏光全反射蛍光XAFSによる金属-担体相互作用の研究」. SPring-8 触媒評価研究会 2004(京都).
  8. K. Asakura, *Metal -Support Interaction Studied by 3 dimensional XAFS*. 2004, *Academica Sinica: Taipei*.
  9. K. Asakura, *Chemical Mapping of Surfaces using Energy-filtered X-ray Emission Electron Microscopy and X-ray Aided Non-contact Atomic Force Microscopy*. 2004, SRC: Taiwan.
  10. 堤哲也, 新美大伸, 松平宣明, 川崎貴博, 朝倉清高, 安福秀幸, 嘉藤 誠, 北島義典, 岩澤康裕. 「Wien filterを用いたEXPEEM法の現状と可能性」. 東京大学物性研究所短期研究会 「LEEM/PEEMをもちいた表面研究の新しい展開」. 2004, (柏市) .
  11. K. Asakura, *Chemical Mapping of Catalyst Surfaces using X-ray Photo Emission Electron Microscopy and Probe Microscopy*. 2004, (Berlin) .
  12. 鈴木秀士, 小池祐一郎, 藤川敬介, 田旺帝, 野村昌治朝倉清高. X線とNC-AFMによる元素マッピング法への可能性. 触媒討論会. 2004 (仙台) .
  13. 河合秀俊, S.T.Oyama 田旺帝, 朝倉清高, 阪東恭子, 葭村雄二, Yong-kul Lee. Ni<sub>2</sub>P脱硫触媒の高温高压下 in-situ XAFS測定. XAFS 討論会, 2004, (京都) .
  14. T.K. H. Niimi, W-J. Chun, S. Suzuki, M. Kato, M. Kudo, and K.Asakura. *An Aberration-Corrected Multipole Wien Filter Energy Analyzer for Energy Filtered X-ray Photoemission electron microscopy(EXPEEM)*. LEEM-PEEM IV. 2004. Twente.
  15. 朝倉清高. 赤外自由電子レーザーを用いた固体表面の触媒反応制御の可能性 科研費学術創成研究「赤外自由電子レーザーの高性能化とそれを用いた光科学成果報告会. 2004 (東京) .
  16. 鶴城真優子, 宇野奏絵, 朝倉清高, 藤川高志 Ni K-edge XANES によるカーボンナノチューブ中のNiの構造解析, 日本物理学会. 2005 (東京) .
  17. Y.Koike. W.-J. Chun, K. Ijima, Y. Tanizawa, and Y.Iwasawa, T.Shido, Ki. Asakura. *Polarization Dependent Extended X-ray Absorption Fine Structure Studies on Metal-Oxide Interface Structure*. in 13th *International Congress on Catalysis*. 2004 (Paris).
  28. 新美大伸, 嘉藤誠, 川崎貴博, 宮本 剛志, 鈴木秀士, 田旺帝, 工藤政人. 工藤政都, 河原直樹, 堂井真, 塚本勝美, 朝倉清高 , 高次収差補正型多極子Wien フィルタを用いた実験室サイズエネルギー選別X線光電子放出顕微鏡の開発. 表面科学会. 2004(東京).

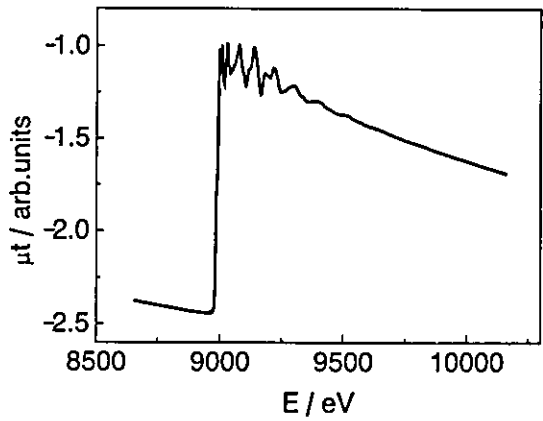


図1 Cu K吸収端XAFS スペクトル

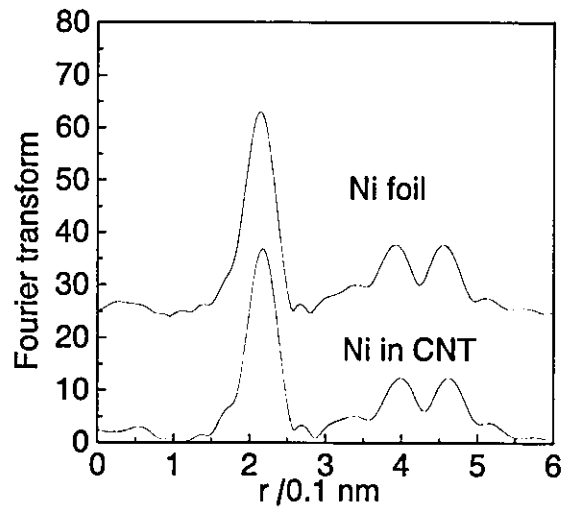


図2 フーリエ変換 上: Ni foil、下: CNT中のNi(未洗浄)

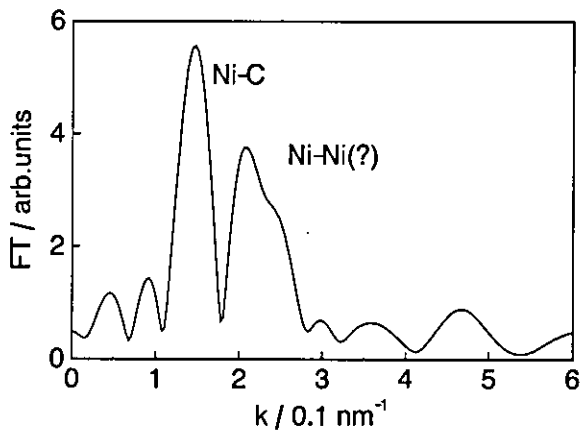


図3 洗浄処理後のNiのフーリエ変換

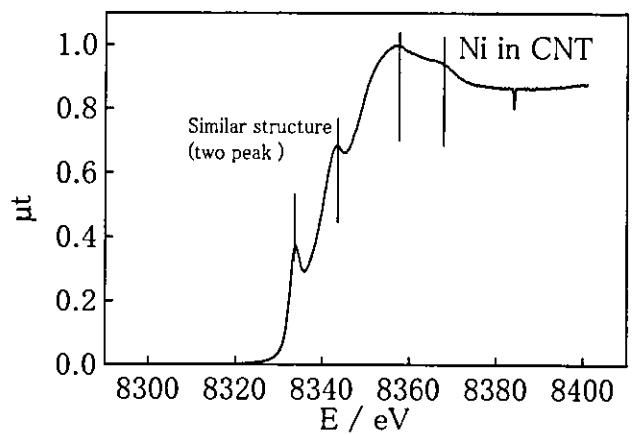


図4 カーボンナノロッド中のNiのXANES スペクトル(Ni除去処理後)

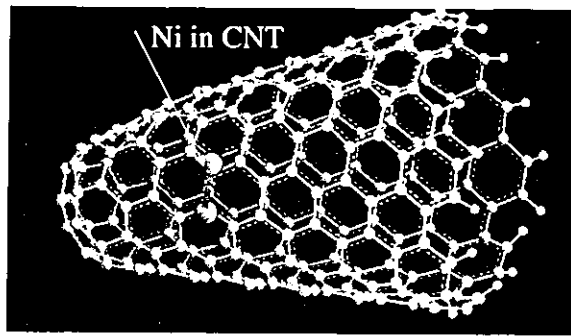


図5 モデル構造

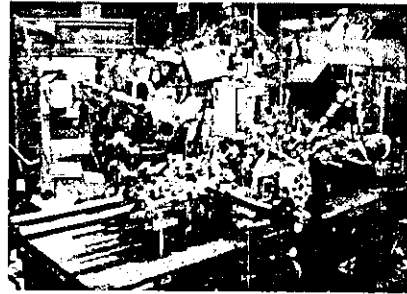
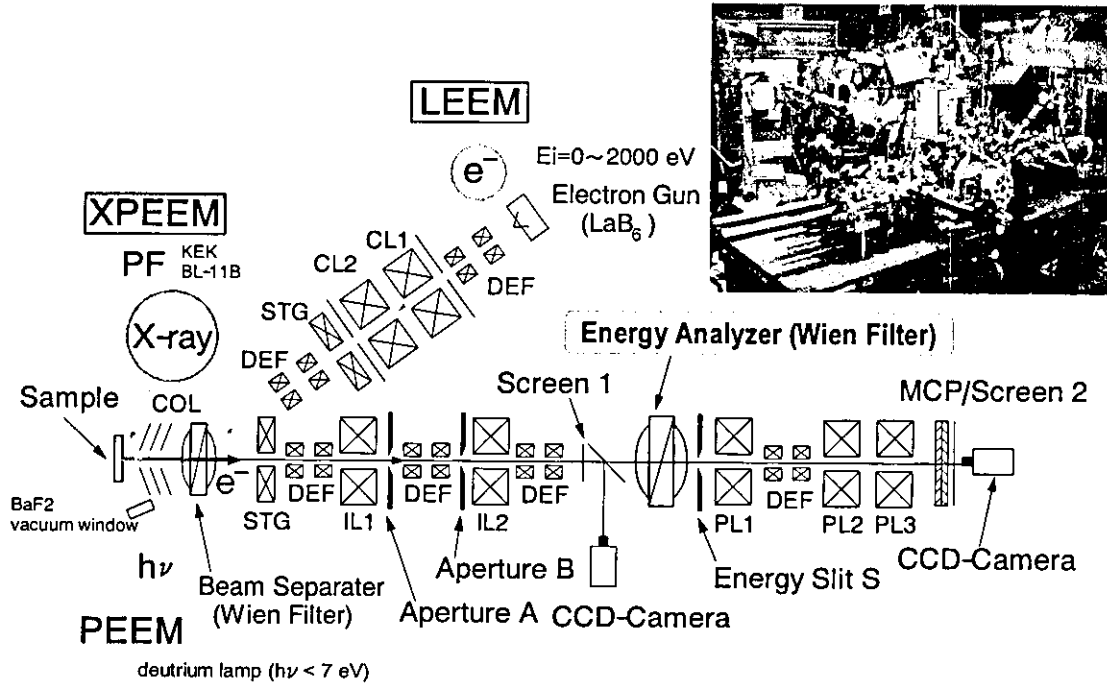


図6 EXPEEM装置の概念図

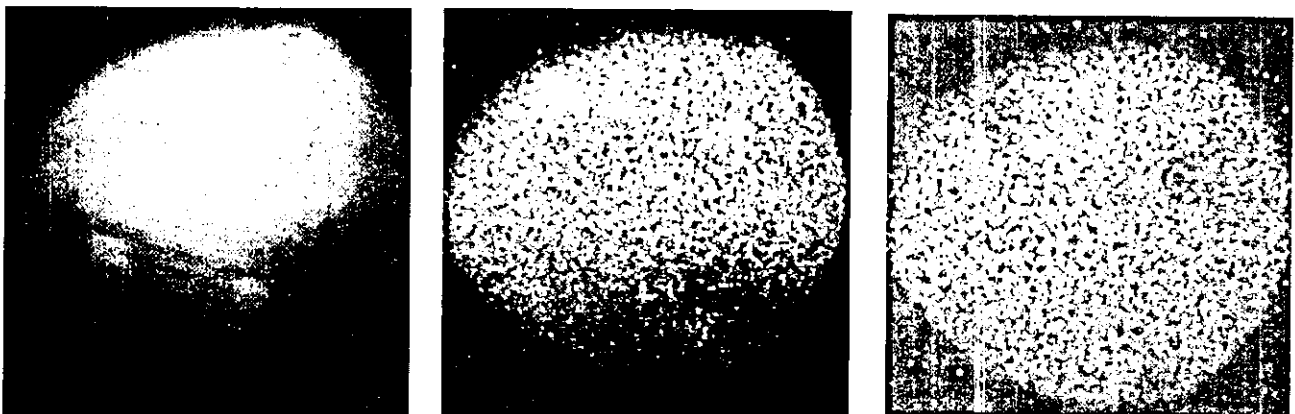


図7 PFで取得したEXPEEM像 : それぞれ、0eV付近の2次電子(a)、Au $3d_{5/2}$ 光電子(b)、Ta  $3d_{5/2}$ 光電子(c)を選別し、結像した。像のため込み時間は 10 sec(a), 60 min(b), 30 min(c)である。光子エネルギーは 2380 eVである。

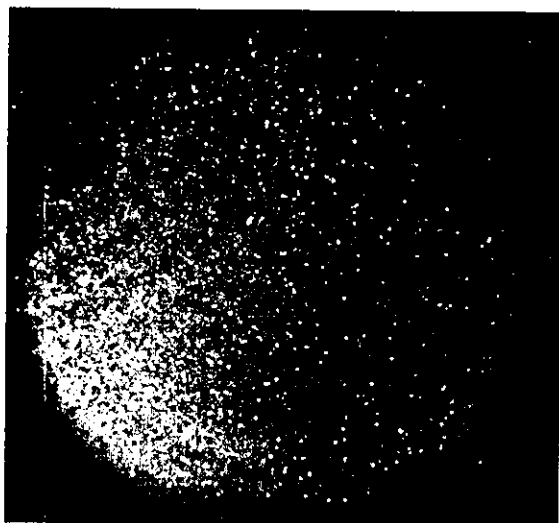


図8 新型XPEEMによるNi メッシュ像

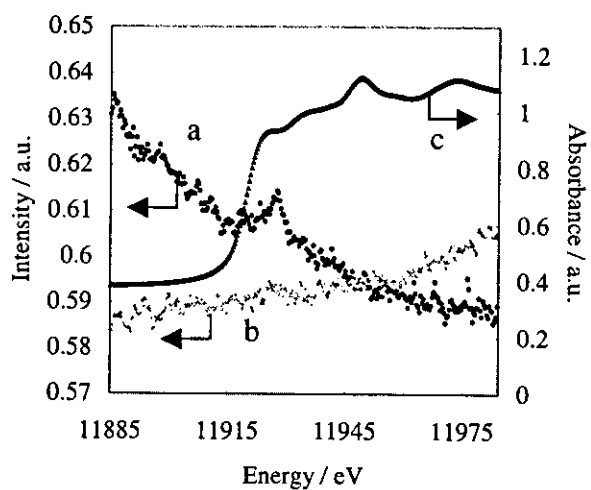


図9 X線によるNC-AFMチップ先端と表面との相互作用の変化  
 (a)チップ先端をAuにおいた場合のX線による力の変化  
 (b) チップ先端をSiにおいた場合のX線による力の変化  
 エネルギースキャン範囲はAuのL3吸収端付近、  
 (c)比較のためのAu L3吸収スペクトル

## 分担研究報告書

### カーボンナノチューブの細胞に対する影響 —アルギン酸ビーズに内包されたカーボンナノチューブによる細胞増殖及び 芳香族化合物の吸着に関して—

柴 肇<sup>1</sup>、古月文志<sup>2</sup>、進藤正信<sup>3</sup>、向後隆男<sup>3</sup>、亘理文夫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>富士レビオ(株)先端研究部、<sup>2</sup>北海道大学大学院地球環境科学研究科

<sup>3</sup>北海道大学大学院歯学研究科

#### 研究要旨

また、カーボンナノチューブ (CNT) をアルギン酸ビーズに内包し、細胞 (Balb 3T3) を用いて、その増殖に対して CNT が何らかの影響を示すかどうか確認した。材料としては、アルギン酸ビーズに内包した CNT 及び活性炭、コントロールとして何も含まないアルギン酸ビーズを用いた。細胞の増殖を MTS 法によりモニターしたところ、コントロールと同様の増殖及び生存を示し、CNT による影響は全く観察されなかった。また、細胞毒性を指標として、CNT を内包したアルギン酸ビーズへの芳香族化合物の吸着力の程度を評価した。CNT を内包したアルギン酸ビーズをマイトマイシン C (MMC) を加えた培養液中に懸濁、混和しながら放置した。その後、遠心によりビーズを分離し、上清の培養液を用いて細胞 (Balb 3T3) を培養して、MMC の毒性を評価した。CNT を内包したビーズが MMC を吸収して培地中の MMC 濃度が下がれば、細胞毒性も低下するはずである。コントロールとして何も含まないビーズ、活性炭を含むビーズを用いて同様の実験を行った。その結果 CNT を含むビーズ、活性炭を含むビーズで処理した培養液ともに、何も内包しないビーズで処理した培養液とほぼ同等の細胞毒性を示した。したがって本実験の条件では、CNT による MMC の吸着除去効果は観察されなかった。ただし、活性炭を内包するビーズでも効果がなかったことから、内包されている CNT や活性炭の量にくらべて MMC の濃度が高すぎて、吸着のキャパシティを超えていた可能性もある。今後さらに吸着量とのバランスを考えて評価を行う必要がある。

1. MTS 法を用いた細胞生存率測定によるアルギン酸ビーズに内包されたカーボンナノチューブの細胞増殖促進物質としての機能評価

#### A. 研究目的

マウス細胞 (Balb 3T3) のアルギン酸ビーズに内包されたカーボンナノチューブ (CNT) が与える影響について評価した。

#### B. 研究方法

古月らの方法により調製したカーボンナノチューブ (CNT) 内包アルギン酸ビーズ、活性炭内包アルギン酸ビーズ、およびそれらを含まないコントロールアルギン酸ビーズを、精製水によって 5 倍希釈しオートクレーブ滅菌した。これらを滅菌済み精製水によってさらに希釈し、1000、500、100 mg/ml をそれぞれ調製した。調製したアルギン酸ビーズ溶液と 10% の FBS を含む DMEM 培地を 1 対 9 の比で混合し、終濃度 100、50、10



mg/ml の各種アルギン酸ビーズ溶液を含む培地を調製した。

Balb 3T3 を、96 穴プレート 3 枚(各 60 穴)に 2000 cell/well ずつまき、10% FBS を含む DMEM 培地 200  $\mu$ l で 37  $^{\circ}$ C において 3 日間培養した。培養液を除去後、上記の各種アルギン酸ビーズを含む培地 200  $\mu$ l を 5 穴ずつ加え、37  $^{\circ}$ C において培養を継続し、処理を開始した。

処理後 1 日目の細胞生存率を MTS 法により確認した。MTS 法は Promega 社製 CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit を用い、そのプロトコールに従った。

### C. 研究結果

Balb 3T3 を各種アルギン酸ビーズにて処理後、1 日目の細胞生存率を MTS 法により測定した結果をそれぞれ図 1 に示す。但し、生存率は MTS 処理 120 分後の  $A_{485}$  の値から求めた。

図 1 に示した処理後 1 日目の結果では、コントロールとして用いたアルギン酸ビーズで処理した細胞はアルギン酸ビーズ未処理細胞に比べて、100 mg/ml、50 mg/ml、10 mg/ml 処理下において細胞増殖における活性化が顕著に見られた。例えば、10 mg/ml アルギン酸ビーズ処理下では、未処理の約 1.6 倍に相当した。

一方、活性炭、又は CNT を内包したアルギン酸ビーズにて処理した細胞は、50 mg/ml、10 mg/ml 下では、同様に細胞増殖における活性化が観察されたが、細胞増殖活性化への効果は、コントロールとして用いたアルギン酸ビーズ処理下における効果と同程度であった。また、100 mg/ml 下でも同様に細胞増殖の効果が観察されるものの、明らかにその効果が低下していることが分かった。

つまり、50 mg/ml、10 mg/ml 下ではアルギン酸ビーズによる細胞増殖の活性化が顕著に見られ、

活性炭及び CNT を内包することによる細胞増殖活性化における効果に差異は認められなかった。

### D. 考察

本研究ではカーボンナノチューブを内包したアルギン酸ビーズが Balb 3T3 の生育に与える影響を解析した。実験には古月らの方法により調製したアルギン酸ビーズ、カーボンナノチューブを内包したアルギン酸ビーズ、活性炭を内包したアルギン酸ビーズを用い、濃度範囲は 10 $\sim$ 100 mg/ml とした。その結果、Balb 3T3 細胞はアルギン酸ビーズの濃度に関わらず、約 1.6 倍程度の細胞増殖活性化効果が見られた。また、活性炭、又は CNT を内包することにより、100 mg/ml 濃度下では本来のアルギン酸ビーズの細胞増殖活性化効果よりも低下するものの、50 mg/ml、10 mg/ml 下ではアルギン酸ビーズのみの処理化で見られた効果と同程度の細胞増殖活性化効果が見られた。

このことから、活性炭、又は CNT を内包したアルギン酸ビーズ処理は、Balb 3T3 の生存率が未処理に比べて増加したが、未内包のアルギン酸ビーズ下と同程度であったことから、増殖の促進および阻害のどちらにも影響しないといえる。

### E. 結論

MTS 法を用いた Balb 3T3 生存率の測定結果より、アルギン酸ビーズへの CNT または活性炭の内包は、細胞増殖促進能および細胞障害能のどちらも有していないことが明らかとなった。

2. カーボンナノチューブを内包したアルギン酸ビーズへの芳香族化合物の吸着及び解離—細胞増殖テストによる観察—

### A. 研究目的

マイトマイシン C (MMC) を用いた細胞毒性を指標として、カーボンナノチューブ(CNT)を内包したアルギン酸ビーズへの芳香族化合物の吸着力の程度を評価した。

MMC は、芳香族骨格を持つ抗腫瘍抗生物質である。まず、これをあらかじめ CNT を内包したアルギン酸ビーズに吸着させ、次に、未吸着画分である上清を培養液に添加して細胞の生存率を測定することにより、MMC の未吸着量を測定した。

CNT を内包したビーズが MMC を吸収して培地中の MMC 濃度が下がれば、細胞毒性も低下するはずである

## B. 研究方法

CNTを内包したアルギン酸ビーズ 2 g を、マイトマイシン C (MMC) (100, 25, 6.25, 1.56, 0 µg/ml)を加えた培養液 (10 % FBS/ DMEM) 中に懸濁、混和しながら室温で 1 時間放置した。その後、遠心によりビーズを分離し、上清液を分離した。

一方、細胞 (Balb 3T3) を 48 穴プレートに 1 ウェル当たり 2 千細胞まき、37 °C で 3 日間培養した。培養後、上記の上清液を培養液として培地交換を行い、37 °C で培養して、MMC の毒性を評価した。CNT を内包したビーズが MMC を吸収して培地中の MMC 濃度が下がれば、細胞毒性も低下するはずである。コントロールとして何も含まないビーズ、活性炭を含むビーズを用いて同様の実験を行った。

細胞生存率を MTS 法により確認した。MTS 法は Promega 社製 CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit を用い、そのプロトコールに従った。

## C. 研究結果

その結果 CNT を含むビーズ、活性炭を含むビーズで処理した培養液ともに、何も内包しないビーズで処理した培養液とほぼ同等の細胞毒性を示した。したがって本実験の条件では、CNT による MMC の吸着除去効果は観察されなかった。

## D. 考察

本実験において、CNT を含むビーズ、活性炭を内包するビーズでも効果がなかったことから、内包されている CNT や活性炭の量にくらべて MMC の濃度が高すぎて、吸着のキャパシティーを超えていた可能性もある。今後さらに吸着量とのバランスを考えて評価を行う必要性がある。

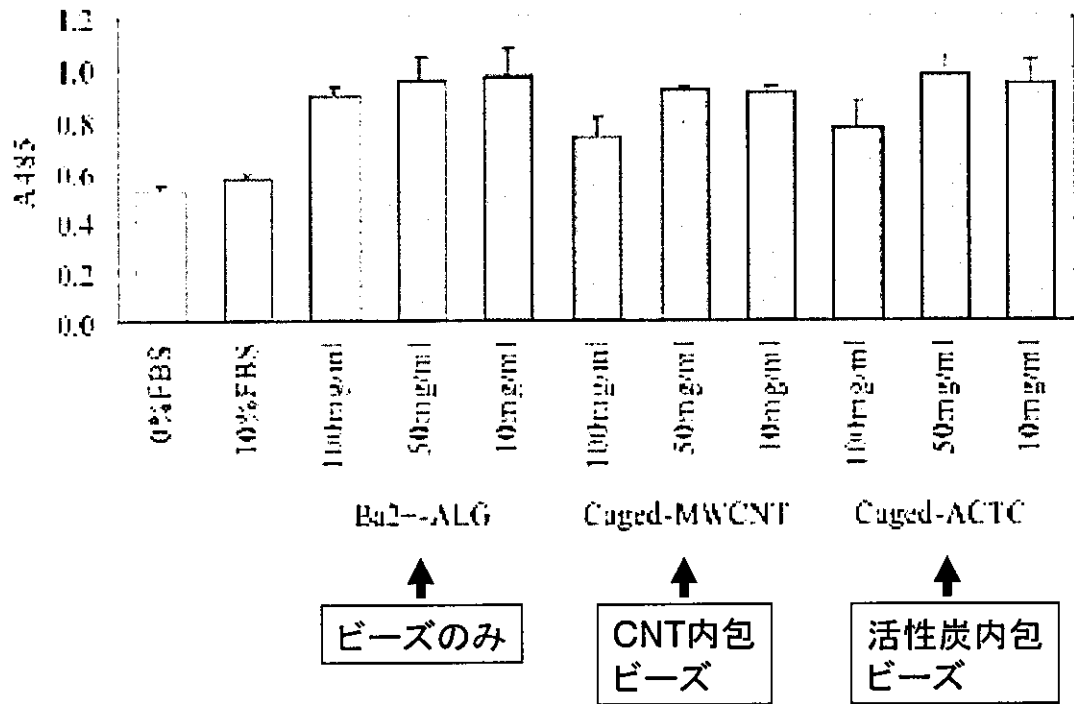
## E. 結論

マイトマイシン C (MMC) を用いた細胞毒性を指標として、カーボンナノチューブ(CNT)を内包したアルギン酸ビーズへの芳香族化合物の吸着力の程度を評価した。CNT を内包したアルギン酸ビーズをマイトマイシン C(MMC)を加えた培養液中に懸濁、混和しながら放置した。その後、遠心によりビーズを分離し、上清の培養液を用いて細胞 (Balb 3T3)を培養して、MMC の毒性を評価した。CNTを内包したビーズがMMCを吸収して培地中の MMC 濃度が下がれば、細胞毒性も低下するはずである。コントロールとして何も含まないビーズ、活性炭を含むビーズを用いて同様の実験を行った。その結果 CNT を含むビーズ、活性炭を含むビーズで処理した培養液ともに、何も内包しないビーズで処理した培養液とほぼ同等の細胞毒性を示した。したがって本実験の条件では、CNT による MMC の吸着除去効果は観察されなかった。ただし、活性炭を内包するビーズでも効果がなかったことから、内包されている CNT や活性炭の量にくらべて MMC の濃度が高すぎて、吸着のキャパシティーを超えていた可能性も

ある。今後さらに吸着量とのバランスを考えて評価  
を行う必要がある。

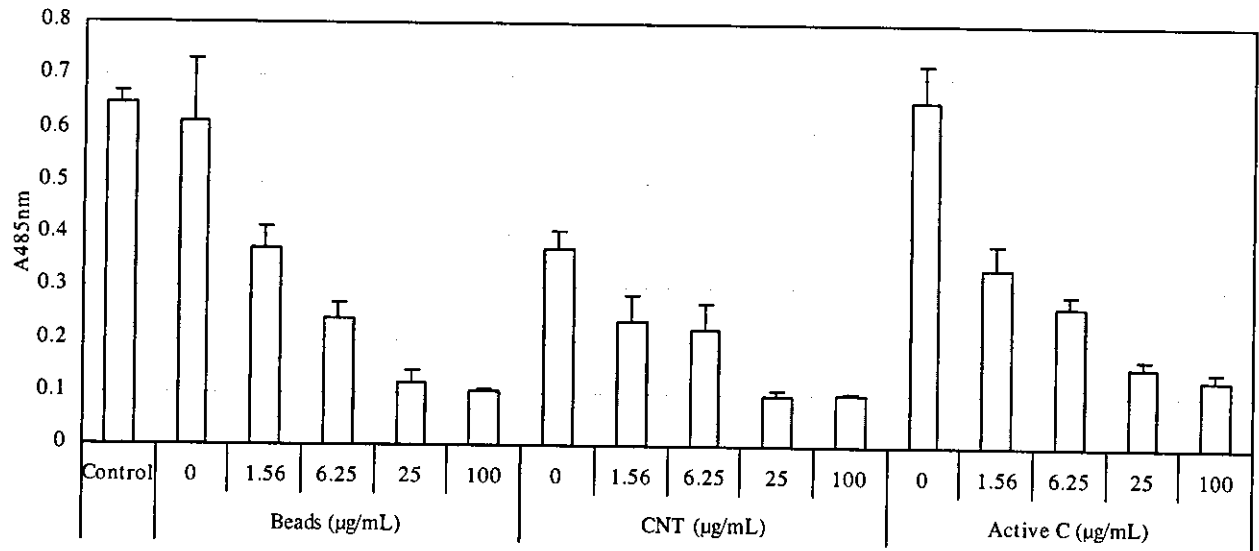
図1

### 各種アルギン酸ビーズの細胞増殖に対する影響



注1) 各バーの上下には標準偏差を示した。

図 2



注1) 各プロットの上下には標準偏差を示した。

## カーボンナノカプセルの加熱時安定性評価 及び生体内ナノ微粒子の状態分析に関する研究

主任研究者	亙理 文夫	北海道大学大学院歯学研究科 教授
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	朝倉 清高	北海道大学触媒化学研究センター 教授
研究協力者	横山 敦郎	北海道大学病院歯科診療センター 講師
研究協力者	赤坂 司	北海道大学大学院歯学研究科 助手
研究協力者	田村 一央	北海道大学大学院歯学研究科 大学院生

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の粒子であり、生体内での造影剤やトレーサーなどへの応用が期待されている。ナノカプセル精製時の内包炭化物の加熱による変化を調査した。生体材料の中でも最も生体親和性が高いとされる純チタンを埋入した生体組織中の微量Tiの状態を放射光を用いたX線吸収微細構造 (XAFS) 測定で分析し、金属Ti微粒子、及びanatase型の酸化チタン微粒子の存在を確認した。

### A. 研究目的

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 (図1)。これは内部に希土類を含有するため、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。ナノカプセルは内部に希土類炭化物を内包しており、カプセルの精製時の加熱処理による酸化が懸念され、カーボンナノチューブ等より精製条件に制約がある。そこでナノカプセル精製時の内包炭化物の加熱による変化を調査した。

また チタンは生体親和性が高く、骨との結合性が良いことから歯科用ならびに医療用インプラント材料として広く用いられている。チタンインプラントは特に化学的安定性に優れ、生体内の環境では腐蝕や溶出を起こさないと考えられているが、一部のインプラント周囲の組織からは蛍光X線分析やICP発光分光分析などでチタンと思われる微粒子の存在が

報告されている。組織中へのチタンの移行とインプラントの成否の関係は明らかでなく、また組織中のチタンの存在形態についても報告されていない。そこで本研究では歯科用チタンインプラント近傍から採取されたヒト粘膜組織中でのチタン様の微粒子の分布及び化学状態をX線分析顕微鏡及び放射光を用いたX線吸収微細構造 (XAFS) により分析し、インプラントから生体組織へのチタンの移行について検討した。

### B. 研究方法

#### 【生体組織中のチタン類似微粒子の分析】

チタンインプラント二次手術の際に患者より除去された口腔粘膜組織を凍結乾燥し、以下の分析に供した。なお本実験は北海道大学大学院歯学研究科倫理委員会の認可及び患者本人の了承の元で行った。XAFS測定は高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所

放射光科学研究施設 (KEK-PF) BL-9Aにて行った。シンクロトロン放射光はSi (111) モノクロメーターにて分光され、高次光除去用ミラーにより高次高調波を除去した。X線分析顕微鏡にてTiの局在が見られた位置を中心に約1mm四方の面積に入射光を照射し、蛍光法によりXAFSスペクトルを測定した。蛍光法は19素子半導体により行った。

#### 【ナノカプセルの加熱時安定性】

Y, Ce, La, Nd, Gd, Dy 含有カーボンナノカプセルを大気中で400℃, 450℃で30分加熱し、加熱前後の変化をX線回折測定 (Rigaku Multiflex) により評価した。また一部試料については、大気酸化後に混酸中で50℃×5時間、超音波処理したものについても同様に調査した。

### C. 研究結果

#### 【生体組織中のチタン類似微粒子の分析】

Tiインプラントの埋入手術においてはインプラント本体を顎骨に埋入後、骨との十分な固定を得るため、インプラントの上部をTi製カバースクリューで封鎖し、粘膜を縫合して3~6ヶ月負荷を与えず静置する。この間粘膜はTiと接触することになる。その後、インプラントの上方の粘膜を一部切除してX線分析顕微鏡 (XSAM) によりTiの元素分布を測定した結果を図1に示す。試料Aでは粒子状の、試料Bでは広範囲に広がったTiが検出された。

図1の試料AのTi局在部及びTi foil (参照試料) のTi K-edge XAFSスペクトルを図2 (左) に示す。試料AのスペクトルにはTi foil即ち金属Tiに特有な、いくつかのピークが見られており、同試料中に存在しているTiが金属状態と推測される。図1のXSAMの元素分布像からも粒子状物質の存在が推測されることから、試料A中のTiはインプラント埋入時などに発生した摩耗粉のような金属Ti粒子と考えられた。試料BのXAFSスペクトルを図12 (右) に示すが、TiO<sub>2</sub> (anatase) と思われるTiが検出された。

#### 【ナノカプセルの加熱時安定性】

各種希土類含有ナノカプセルを400, 450℃で大気酸化した場合の希土類炭化物の変化を図3に示す。

いずれのCNCにおいても400℃という比較的低温から酸化が起こることが分かる。大気酸化によるアモルファスカーボンなどの除去については、MWCNTでは500℃程度の高温で行っていたが、MECNCについては更に低温での大気酸化か、湿式酸化などを用いる必要があることが判明した。

### D. 考察

生体内のTiのXAFS測定においては、Tiに隣接した口腔粘膜組織から金属Ti (微粒子状) とTiO<sub>2</sub> (anatase) が検出され、XAFS測定の有効性が確認された。金属Tiに関してはインプラント埋入手術時に発生した摩耗分の可能性が示唆された。またanataseの形態でTiが生体組織中に存在する理由としては、インプラント表面の酸化皮膜が脱落して組織中に移行したか、溶出したTiが組織中で酸化物を形成したことが考えられ、極めて興味深い結果が得られた。

またナノカプセルの加熱時安定性については、400℃という比較的低温から酸化が起こることが判明し、大気酸化によるアモルファスカーボンなどの除去については、MWCNTでは500℃程度の高温で行っていたが、MECNCについては更に低温での大気酸化か、湿式酸化などを用いる必要があることが判明した。

### E. 結論

XAFSを用いることで生体試料中の微量チタンの状態を分析することが可能となった。チタンインプラント周囲組織に含まれるチタンの状態は金属Ti, TiO<sub>2</sub> (anatase) などの形態を取り得ることが判明した。また希土類含有カーボンナノカプセルについては400℃以下の低温で大気酸化処理をする必要があることが分かった。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Uo M., Watari F.: Rapid analysis of dental metallic restoratives using X-ray Scanning Analytical Microscope, *Dental Materials* 20, p.611-615, 2004
- 2) Uo M., Tanaka M., Watari F.: Quantitative analysis of biological specimens by X-ray scanning analytical microscope, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B Applied Biomaterials* 70B, p.146-151, 2004
- 3) Uo M., Okamoto M., Watari F., Tani K., Morita M., Shintani A.: Rare earth oxide containing fluorescent glass filler for composite resin, *Dental Materials Journal*, 24(1), 2005 掲載予定

### 2. 学会発表

- 1) Uo M., Akasaka T., Rosca I.D., Watari F., Yokoyama A., Omori M., Sato Y., Tohji K., Preparation of the carbon nanotubes mixed metal and resin for dental materials, 205th Symposium of Electro Chemical Society (San Antonio, 2004/5)
- 2) ○宇尾基弘・赤坂 司・朝倉清高・横山敦郎・

- 大森 守・佐藤義倫・田路和幸：カーボンナノチューブの歯科・生体材料への応用，第26回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム（岡崎，2004年1月7～9日），同要旨集，p.115，2004
- 3) ○宇尾基弘・赤坂 司・亓理文夫 他：蛍光性を持つコンジットレジン用ガラスフィラーに関する研究，第43回日本歯科理工学会学術講演会（千葉，2004年4月10,11日），*歯科材料・器械*, 23(2), p.135, 2004
- 4) ○宇尾基弘・赤坂 司・亓理文夫・朝倉清高・横山敦郎・田村 央・戸塚靖則：XAFSを用いた金属インプラント周囲組織の分析，第7回XAFS討論会（京都，2004年7月29～30日），同要旨集，p.43-45，2004
- 5) ○宇尾基弘・赤坂 司・亓理文夫：インプラント周囲組織のXAFSによる分析，第44回日本歯科理工学会秋期学術講演会（京都，2004年9月24,25日），*歯科材料・器械*, 23(5), p.327, 2004

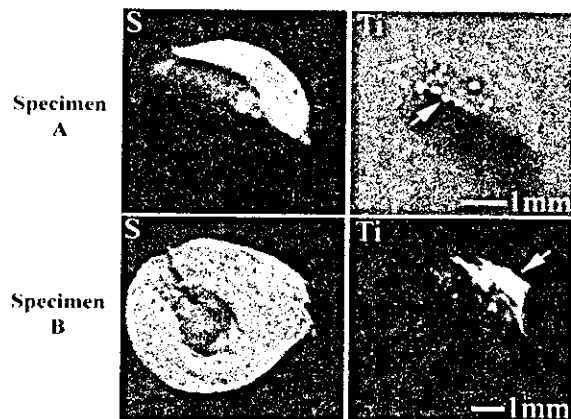


図1 Ti含有口腔内組織のXSAM像

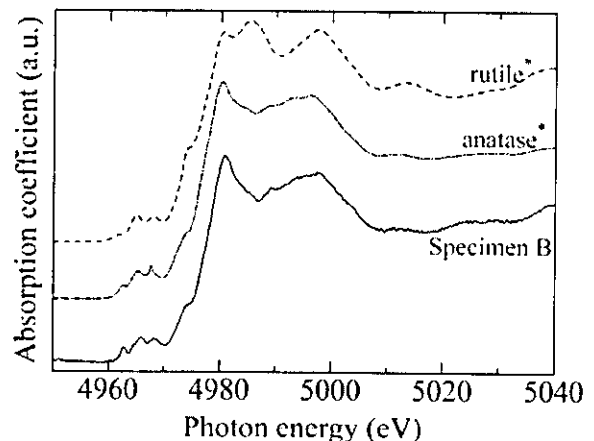
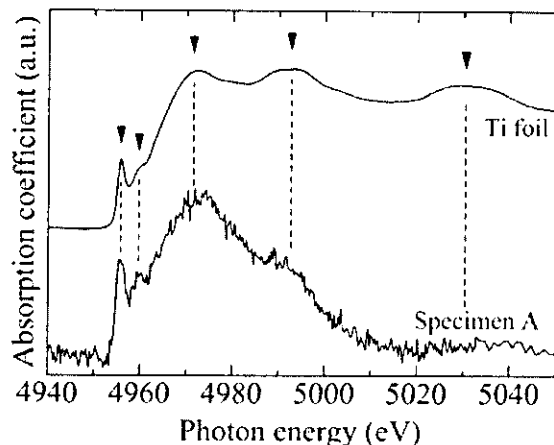


図2 Tiインプラント周囲組織のXANESスペクトル（左：金属Ti，右：anatase）



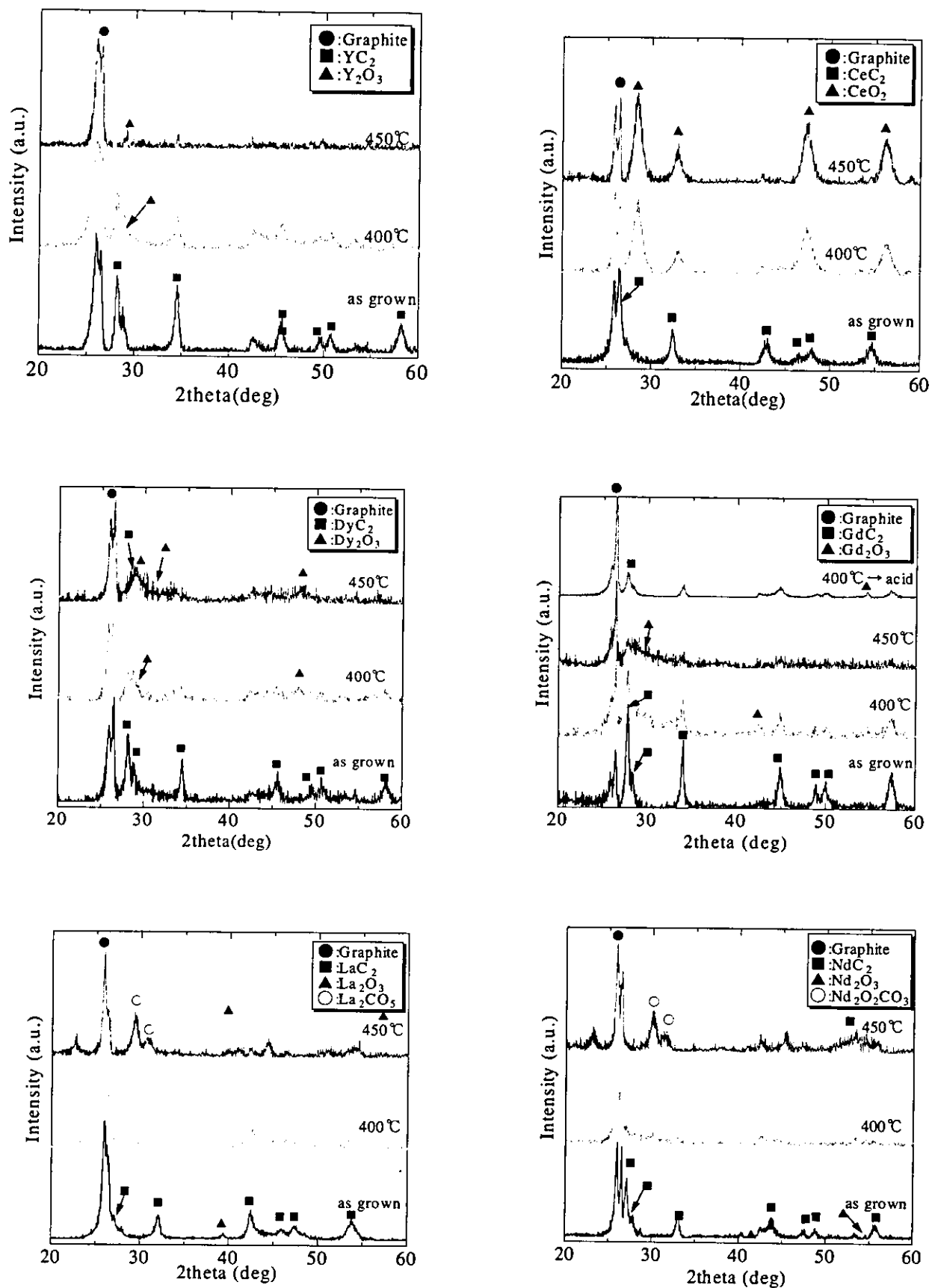


図3 各種カーボンナノカプセルの加熱処理によるX線回折パターンの変化

分担研究報告書

ハイパーサーミア（温熱療法）への応用を目指した磁性ナノ粒子の合成とサイズ分級

分担研究者 田路和幸 東北大学大学院環境科学研究科 教授

**研究要旨** 本研究班では、カーボンナノチューブ（Carbon Nanotubes: CNTs）・ナノファイバー（Carbon Nanofibers: CNFs）などの特異形状炭素物質、及び磁性ナノ粒子を生体材料（臓器）、HIV、癌治療、遺伝子治療のベクターとして応用するために、CNTs・CNFsの水溶化、サイズ制御、磁性ナノ粒子の合成を行ってきた。今回は、温熱療法（ハイパーサーミア；MFH）に応用する磁性ナノ粒子について検討した。MFHは、1) 外部磁場により目的部位までの誘導が可能、2) 磁性を用いた位置検出が可能、3) 磁性粒子を発熱体として用いるため、体内の深部であっても磁性粒子の存在する部位のみを加熱することが可能、などの利点がある。本研究では、磁性粒子の発熱に関する理論式を用いて、MFHに最適な磁性粒子がマグネタイトであることを確認し、直径8 nm以下のナノ粒子が発熱に貢献せず、直径11-13 nmのナノ粒子の発熱量が最大になることを見出した。さらにマグネタイトナノ粒子の合成・サイズ分級を行い、発熱測定を行った。

磁性流体ハイパーサーミアの理論的検討と磁性流体ハイパーサーミアへの適応を目指した磁性ナノ粒子の合成

A. 研究目的

近年、磁性ナノ粒子を用いた、MRIの造影剤、ウイルスやDNAの濃縮・分離、ドラッグデリバリー、ハイパーサーミアなど、数多くの応用が検討されているが、特に磁性流体ハイパーサーミア（Magnetic Fluid Hyperthermia; MFH）についての検討が盛んに行われている。MFHは、腫瘍細胞を加温して死滅させるという癌治療法の一つである。磁性ナノ粒子が生体内で凝集しないように表面修飾を施し、それを血管などから体内に注入し、外部磁場により目的とする腫

瘍細胞に誘導する。その後、腫瘍細胞に磁性ナノ粒子を分散させ、十分な磁場強度と周波数の交流磁場を印加することにより、粒子の発熱を引き起こす。

MFHの利点は、1) 外部磁場により目的部位までの誘導が可能、2) 磁性を用いた位置検出が可能、3) 磁性粒子を発熱体として用いるため、体内の深部であっても磁性粒子の存在する部位のみを加熱することが可能、などが挙げられる。もっとも大きな利点は、3) に示したように磁性粒子が存在する部分のみを加熱できる、つまり腫瘍細胞のみに磁性粒子を分散させることができれば、健康な細胞に悪影響を与えることなく、腫瘍細胞のみの局部加熱が可能である。一方、腫瘍細胞を十分に加熱することが可能な

量の磁性粒子を腫瘍細胞内に分散できるかが課題となる。

さらなるMFHの発展のためには、MFHに最も適したフェライト粒子の物性を知る必要がある。しかしこれまでMFHの検討が多くなされてきた中で、MFHに最適なフェライト粒子の物性について十分な議論はされていない。

本研究では、フェライト粒子の発熱機構、発熱容量の理論式を用いて、周波数、粒子径、磁氣的物性の影響を検討し、MFHに最適なフェライト粒子の種類、物性について検討を行った。

理論式により求められたフェライト粒子に必要とされる物性を満たす粒子の合成を行った。さらに、交流磁場発生装置として、周波数を200kHz - 600kHzの間で1kHz刻みに調節できる装置の設計を行い、本装置を用いて磁性流体の発熱測定を行った。

## B. 研究方法

### －MFHの理論解析－

磁性ナノ粒子は、単磁区構造で界面活性剤により液体中に分散しており、渦電流による発熱は、粒子が小さいため無視できると仮定した。交流磁場を印加した際の発熱量を理論的に計算し、周波数、粒子径の影響を検討した。本計算式は、Rosensweigらの論文を参照した。

### －マグネタイト粒子の作製とサイズ分級－

MFHの実用化のためには、低粒子濃度で高発熱効率の磁性流体が必要不可欠である。そのため、直径8 nm以下の粒子の除去、11-13 nm粒子を主とした磁性流体の製造が必要となる。直径11-13 nm程度のマグネタイトを得るには、共沈法が最も適していたため、共沈法にて合成を行った。また、マグネタイト合成段階では、直径数 nm程度の違いを持つ粒子を得ることは難しいため、マグネタイト粒子合成後にサイズ分級を行った。

500 ml ビーカーに27%アンモニア水200 mlを入

れ、攪拌機にてよく攪拌しながら、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の0.5 mol/l水溶液と $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の1 mol/l水溶液を100 mlずつ用いて作製した200 mlの混合液を一気に添加し、10分間攪拌を継続した。マグネタイト粒子重量に対して30 wt.%のオレイン酸ナトリウムを添加した後、90 °Cにて1時間加熱攪拌をした。加熱攪拌終了後、磁石の上に静置して粒子を沈降させた後、上澄みの電気伝導率が0.1 mS/m以下となるまで蒸留水にて洗浄を行い、余計なオレイン酸を除去した。洗浄後、上澄みを除去しイソパラフィン系溶剤を適量添加して、100 °Cにて体積変化が起こらなくなるまで加熱攪拌を行い、磁性流体を合成した。上記に示した方法を用いて製造した磁性流体に対して、アセトンを添加することにより、粒子表面のオレイン酸の長さを調整して、サイズ分級を行った。磁性流体にアセトンを適量添加し、マグネット上に静置した。30分後、上部の磁性流体を抜き取ることにより直径8 nm以下の粒子を除去した。

### －交流磁場発生装置を用いた実験－

MFHの理論式を用いて得られた解析結果と実際にマグネタイト粒子を用いて発熱量を測定した結果の比較を行うことは必要不可欠である。そこで、交流磁場発生装置の設計を行った。周波数は、人体への影響を考慮して200kHz - 600kHzの範囲で調整できるものにした。本装置を用いて、磁性流体の発熱測定を行った。

### －実験装置－

装置全体をFig.1に示す。装置は、RF Power Amplifier (GRF5052S Astech)、Matching Box (T020-323A Thamway)、Signal Generator (8684C Hewlett Packard)、Wattmeter (Bird Electronic)と交流磁場発生部分のコイルで構成されている。コイルは、内径50 mmであり、直径4 mmの銅管が21回巻いてある。また、コイル自体の発熱を防ぐため、銅管内部に冷却水を流す。周波数は200kHzから600kHzまで1kHz刻みで調節でき、

出力は 200 W である。

### —実験方法—

磁性流体 6ml を直径 10mm ガラス製の試験管に入れ、コイル中央に固定した後、任意の周波数にて磁性流体の温度上昇を測定した。温度測定には、アルコール温度計を用いた。粒子濃度の調製は、ベース液を用いて粒子濃度 40.3wt.%、飽和磁化 275G の磁性流体を希釈する方法を用いた。

### —評価装置—

SEM 観察は Hitachi S-4100 Scanning Electron Microscope を用い、加速電圧 5kV で行った。TEM 観察では、加速電圧 200kV の Hitachi HF-2000 FIELD EMISSION Transmission Electron Microscope を用いた。

## C. 研究結果と考察

### —単磁区粒子の緩和によるエネルギー損失—

単位体積あたりの緩和による力の散逸は以下のように表される。

$$P = f\Delta U = \mu_0 \pi \chi'' f H_0^2$$

$\mu_0$  : 真空の透磁率  $M$  : 磁化  $\Delta U$  : 内部エネルギーの増加分  $f$  : 周波数

$H_0$  : 交流磁場の振幅  $\omega$  : 磁場の角振動数  
 $t$  : 時間

磁性流体の磁化率は以下のように示される。

$$\chi = \chi' - i\chi'' = \frac{\chi_0}{1 + (\omega\tau)^2} - i \frac{\omega\tau\chi_0}{1 + (\omega\tau)^2}$$

$$\chi_0 = \chi_i \frac{3}{\xi} \left( \coth \xi - \frac{1}{\xi} \right), \quad \xi = \frac{\mu_0 M_d H V_M}{kT}$$

$$\chi_i = \frac{\mu_0 \phi M_d^2 V_M}{3kT}, \quad V_M = \frac{4\pi R^3}{3}$$

$V_H = (1 + \delta/R)^3 V_M$   $\phi$  : 固体の体積比  
 $M_d$  : 磁化  $V_M$  : 粒子の体積

$V_H$  : 界面活性剤層を含んだ粒子の体積  $\tau$  : 緩和時間

### —緩和機構—

単磁区粒子の緩和機構には、Brown 緩和と Néel 緩和の 2 つの緩和機構が存在する。Brown 緩和は、粒子自身の回転による緩和機構であり、Néel 緩和は、粒子内部の磁気モーメントの回転による緩和機構である。粒子直径が大きい場合には緩和時間の長い Brown 緩和が支配的となるが、粒子径が減少することにより、緩和時間のより短い Néel 緩和が支配的になる。

### —各因子の計算結果—

Fig. 2 にフェライト粒子の発熱率と粒子径について示す。発熱率は以下のように示される。

$$\frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{P}{c}$$

$\Delta t$  : 交流磁場印加時間 (s)、 $\Delta T$  : 発熱量 (K)、 $c$  : 比熱 (J/(kg · K))

Fig. 2 より各フェライト粒子の発熱率が粒子径に大きく依存していることがわかる。マグヘマイト粒子の発熱率が最も大きくなっているが、磁性ナノ粒子を体内に注入する際に、水や PBS (生理食塩水) などへ分散させ、磁性流体として用いることが望まれるため、粒子直径 15 nm 以上の磁性ナノ粒子では分散が不可能であるため使用できない。マグネタイト粒子は、その生体適合性がすでに認められており、発熱量も 11-13 nm の粒子直径において、コバルトフェライト、バリウムフェライトに比べて非常に大きいことから、MFH には 11-13 nm のマグネタイトが最も適している。また、マグネタイト粒子において、直径 8 nm 以下の粒子は発熱にほとんど関係しておらず、直径 8-15 nm 程度の粒子のみが発熱に関係していることがわかった。

### —サイズ分級—

Fig. 3(a)にサイズ分級前、(b)にサイズ分級後の試料の TEM 写真を示す。サイズ分級前の試料は、直径 4 nm から 20 nm 程度の粒子を含んでいる。サイズ分級後の試料では、8 nm 以下の粒子を削除することができ、直径 9 nm から 20