

#### 4. 結言

本研究では、三点曲げ試験法を用いることでSWCNTバルク固化体の機械的特性の評価を行った。実験結果よりSWCNTバルク固化体の作製温度の増加に伴い機械的特性の向上が認められた。1400℃で作製したSWCNTバルク固化体の縦弾性係数、破壊強度および破壊エネルギーは、1000℃で作製したものとは比2倍程度高い値を得た。また、SWCNTs間に強固な結合を導入することを目的として、SWCNTsに少量のPCSを添加したSWCNT/PCSバルク固化体を作製した。同条件にて作製したSWCNTバルク固化体と比50%程度上回る機械的特性を示すバルク固化体の作製に成功した。ただし、PCSを添加することによる強度発現因子は明らかになっておらず、SWCNTs間に強固な結合を導入する上で、ナノ領域における組成評価ならびに電子状態の評価は重要な検討課題の一つである。

# カーボンナノカプセルの細胞毒性及び 生体内微粒子のX線顕微鏡とXAFSによる分析

○宇尾基弘<sup>1</sup>・赤坂 司<sup>1</sup>・Rosca Iosif Daniel<sup>1</sup>・亘理文夫<sup>1</sup>  
朝倉清高<sup>2</sup>・横山敦郎<sup>3</sup>・田村一央<sup>4</sup>・戸塚靖則<sup>4</sup>  
(北大院 歯学研究科<sup>1</sup> 歯科理工<sup>2</sup> 触媒化学セ<sup>3</sup> 補綴一<sup>4</sup> 口外二)  
佐藤義倫・田路和幸 (東北大院 工学研究科)

## 1. 目的

カーボンナノカプセル(CNC)は希土類炭化物 (CeC<sub>2</sub> 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 CNCのTEM像

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。生体組織中のチタン及びその他の金属元素についての状態分析が困難な理由として、通常これらの金属元素が極めて低濃度であることがあげられる。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 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。

## 2. 方法

### 【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) を混酸中で 50℃ ×5 日間処理し、同溶液を水酸化ナトリウム水溶液で中和後、透析を行いナノカプセル懸濁液を作製した。同懸濁液を無菌的に生理食塩水中に濃度 0.1 ~ 100ppm となるよう分散し、ラットの肺胞、腹腔マクロファージ及び繊維芽細胞に 0.01 ~ 10ppm の各濃度で投与して通法に従い 1 日培養し、繊維芽細胞の細胞生存率、乳酸脱水素酵素(LDH)産生量及びマクロファージのサイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , M-CSF)産生量から CNC の為害性を評価した。細胞生存率及び増殖率の計測は MTT 変法を用いた比色法により行い、LDH 及びサイトカイン類は計測キットにより行った。

### 【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 2 名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の元で行った。

はじめに X 線分析顕微鏡 (X-ray Scanning Analytical Microscope:以下、XSAM (堀場製作所: XGT-2000V)) により試料中の Ti の分布状態を確認した。観察条件は管電圧・電流 = 50kV, 1mA (Rh ターゲット) とし、3000 秒 / scan の条件で 75 回 scan・積算して元素分布像を得た。

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。XSAM 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、透過法及び蛍光法により 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。

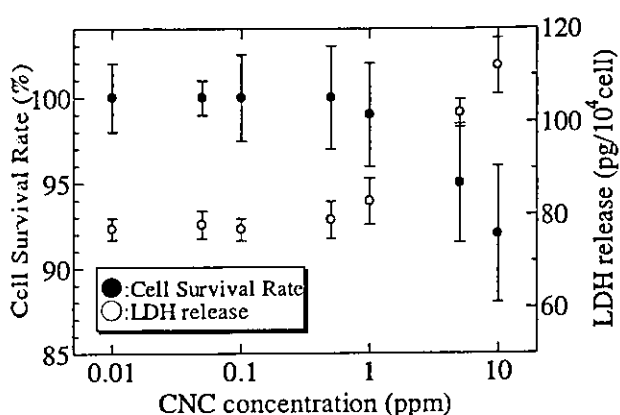


図 2 生存率と LDH 産生量の CNC 濃度依存性

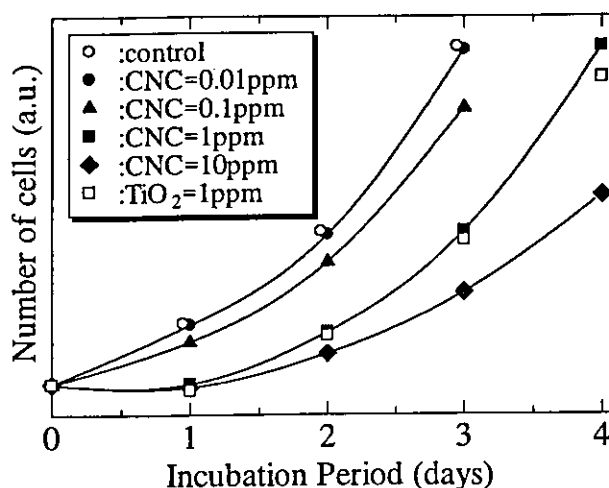


図 3 CNC 存在下での繊維芽細胞増殖率

### 3. 結果及び考察

#### 【ナノカプセルの生体内挙動の評価】

図 2 に CNC を添加した RPMI 培地中でのラット繊維芽細胞の細胞生存率と LDH 産生量の CNC 濃度依存性を示す。CNC 濃度が 1ppm を境にして、それ以上の濃度では細胞生存率がやや低下し、LDH 産生量が増加していることが分かる。LDH は細胞の重大な損傷により放出されるため、CNC が 1ppm 以上で生存率が低下し、LDH が増加することから繊維芽細胞の障害が増加したものと考えられる。

図 3 は繊維芽細胞の増殖率を示しており、CNC 濃度の増加とともに増殖速度が

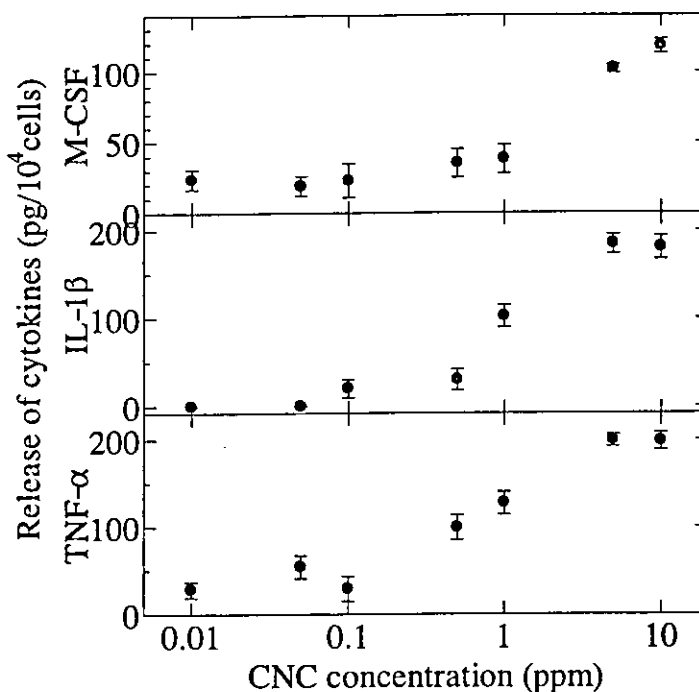


図 4 サイトカイン類産生量の CNC 濃度依存性

低下していることが分かる。CNC が 1ppm の際の増殖率は  $\text{TiO}_2$  が 1ppm の際とほぼ同等であり、増殖への影響は CNC の為害性によるものではなく、粒子の介在による物理的障害によるものと推測される。

図 4 はラット肺胞マクロファージからの M-CSF,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  の産生量の CNC 濃度依存性を示している。いずれのサイトカインとも 0.5 ~ 1ppm 付近を境に産生量が増加している。サイトカイン類は細胞の炎症反応に関わる化学伝達物質であり、産生量の増大はマクロファージへの CNC の刺激の高さを示していると考えられる。1ppm 付近を境に CNC の刺激性が増加するのは、図 2 で示した細胞生存率等の結果と一致している。

CNC は酸処理により分散性を改善しているが、特に培地や生理食塩水のような塩類溶液中では凝集しやすい。特に CNC 濃度が高いほど凝集しやすく、1ppm 付近から明らかに凝集が進むため、先の細胞生存率の低下や刺激性の上昇は CNC の直接的な毒性ではなく、CNC が凝集して物理的に障害となったのではないかと推測される。

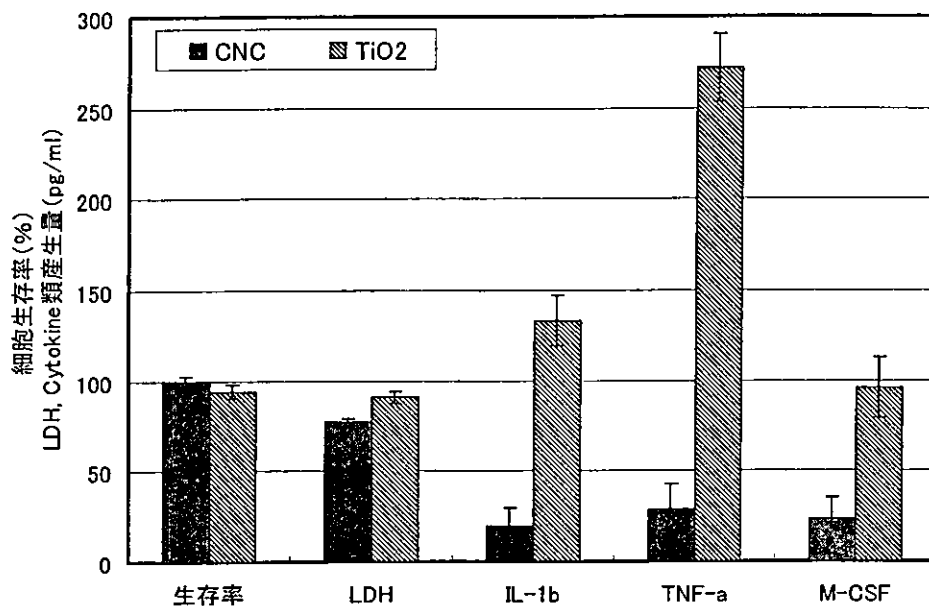


図 5 細胞生存率及び LDH, サイトカイン類産生量の CNC と  $\text{TiO}_2$  (100nm  $\phi$ ) の比較

CNC と  $\text{TiO}_2$  の繊維芽細胞およびマクロファージへの影響を調べたのが図 5 である。(CNC 及び  $\text{TiO}_2$  の濃度は 1ppm とした) 細胞生存率はほぼ同等であり、LDH については  $\text{TiO}_2$  がやや多く、サイトカイン類については  $\text{TiO}_2$  の方が有意に高くなっている。 $\text{TiO}_2$  も化学的に極めて安定で、細胞毒性の低い物質であるが、CNC はそれと同等かそれ以下の刺激性しか示さないことから、細胞毒性・刺激性は極めて低いものと推測された。

### 【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構造をすぐには装着せず、一端インプラントの上部を同じくチタン製のカバースクリューで封鎖し、粘膜を縫合して3～6ヶ月負荷を与えない。その後、インプラントの上方の粘膜を一部切除して、上部構造を装着する。本実験では患者2名から切除した歯肉組織を、患者本人の了承の下に使用した。凍結乾燥した2種類(以下、試料A, Bと称す)の歯肉組織のXSAMによる試料のCa, S, Ti分布像を図6及び図7に示す。

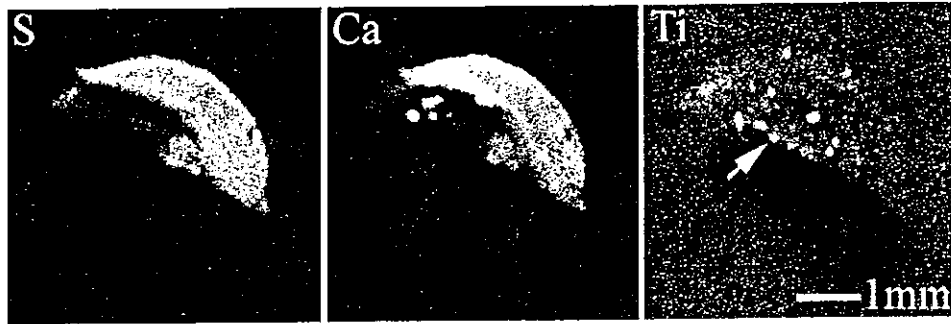


図6 試料AのXSAMによるS, Ca, Ti分布像

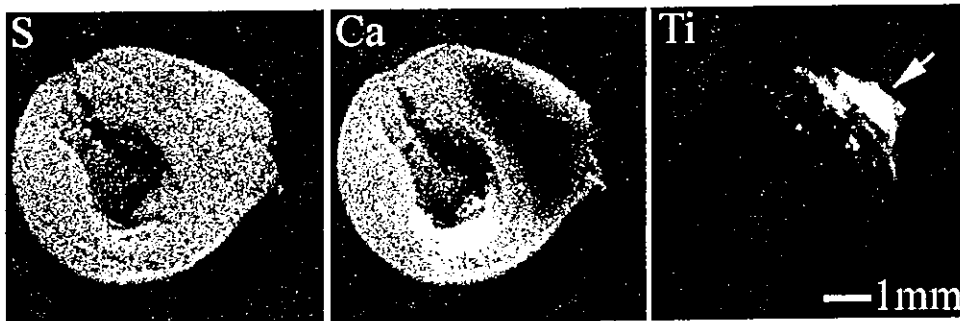


図7 試料BのXSAMによるS, Ca, Ti分布像

S, Caは生体に由来する元素であり、それらの分布像は試料全体の形態を示している。Tiの分布像に於いては、試料内に試料AではTiは点状に局在し、粒子状として存在しているのに対し、試料Bでは試料の一部にTiが比較的均一な濃度で局在している事が分かる。

試料Aの矢印で示した部位及び参照としてTifoilのTi K-edge XAFSスペクトルを図8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6のXSAMの元素分布像からも粒子状物質の存在が観察されており、これらの結果から、試料A中のTiはインプラント埋入時に発生した摩耗粉のような金属Ti粒子と考えられる。

通常インプラント埋入時にはタップを切られたインプラント本体の埋入(ねじ込み)やカバースクリューのインプラント本体へのねじ込みなどで摩耗粉が発生する可能性があり、本試料で検出された粒子状Tiは埋入処置の際に生じた摩耗粉である可能性が高いと考えられる。

次に試料BのTi K-edge XAFSスペクトルを図9に示す。図9のスペクトルは図8に示した金

# MWCNT functionalization

Iosif Daniel ROSCA<sup>a</sup>, Fumio WATARI<sup>b</sup>, Motohiro Uo<sup>b</sup>, Tsukasa AKASAKA<sup>b</sup>

- a. Department of Polymer Science, Faculty of Industrial Chemistry, Polytechnic University of Bucharest, Calea Victoriei, 149, Sector 1, Bucharest, Romania
- b. Hokkaido University, Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, 060-08586, Sapporo, Hokkaido, Japan

## 1. Introduction

Raw MWCNT, being a highly entangled product, is difficult to disperse uniformly in liquids or melts in order to efficiently carry the mechanical load or provide useful transport properties. Two different approaches to separate CNTs are usually used: physical methods and chemical methods. Physical dispersion methods include ultrasonication, ball milling, grinding and high speed shearing. Chemical methods use surfactants or functionalization to change the surface energy of the nanotubes to improve their wetting or adhesion characteristics and to reduce their tendency to agglomerate in the continuous solvent phase. Acid-treatment can result in short lengths in MWCNT. These shortened CNTs can modulate the properties of the CNTs including their dispersion properties. In various solvents functionalized CNTs are solvated as individual tubes, which makes possible to carry out further solution chemistry.

The present study investigates the oxidation of raw MWCNT in nitric acid and assesses the influence of different reaction conditions on the solubility and CNT loss.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Raw MWCNTs were purchased from NanoLabs. Nitric acid 60% was purchased from Wako.

### 2.2 Equipments

The oxidation was carried out in oil bath. The Raman shift of the CNTs during the oxidation was recorded by a Dilor spectrometer. The changes that occurred during oxidation were examined by SEM Hitachi S4000.

### 2.3. Method

In a two-necked round-bottomed flask 0.4g of raw MWCNTs and 40ml of nitric acid 60% were added. The mixture was sonicated for 30min at 35W and 35KHz. Next the reaction mixture was refluxed in an oil bath at 126°C for up to 48 hours. At a predetermined time 1ml of reaction mixture was extracted and added to 15ml of deionized water. The CNTs were washed twice and separated by filtration on polycarbonate membrane filter of 0.2µm pore size. The filtered samples were dispersed in 15ml deionized water with sonicator tip for 2min.

The Raman scattering of the samples was recorded using Ar<sup>+</sup> laser at 514.5nm and 30mW output power.

## 3. Results and discussions

### 3.1 Oxidation kinetics by Raman spectroscopy

As the oxidation affects the graphitic structure of the nanotubes the Raman spectrum changes accordingly. Fig.1 presents the Raman spectra of the raw MWCNTs. The two sharp Raman peaks namely G (Graphite) and D (Disorder) bands will be correlated to the oxidation kinetics.

Selemion の屈曲メカニズムと可動台の作製  
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

これまで Nafion と呼ばれるイオン交換高分子膜を用いたアクチュエータの開発研究を行ってきた。表面を銀メッキした後に含水させた Nafion はわずか 1V の印加電圧下で大きく屈曲し、この Nafion を用いることで外部からの僅かな印加電圧をエネルギー源として微量の液体を汲み出すポンプの試作品を作る事が出来た。しかし、もともと汲み出す力が弱く、更にわずかに、二分程度の連続使用しか出来ないという限界があった。汲み出す力を上昇させるには印加電圧を上昇させるという方法があるものの、印加電圧上昇は Nafion に含まれる水の激しい電気分解を引き起こしてしまい、Nafion の印加電圧下での屈曲性を劣化させてしまう。結果 Nafion のアクチュエータ利用を不可能にしてしまうという問題があった。Nafion に限らずイオン交換高分子膜は含水させ 1V 程度の電圧を印加すると大きく屈曲する。表面を銀メッキした Selemion もそのような屈曲性を示すイオン交換高分子膜の一つである。しかし Nafion と同じ問題点を持っていた。従来手法と異なり我々はこの Selemion を含水させるのではなく、逆に脱水を行ってその印加電圧下での屈曲性を調べた。結果、屈曲に必要なとされる印加電圧は僅かに大きくなり必要消費電力上昇してしまったもののその印加電圧に対する屈曲性は長時間失われず、しかもその印加電圧に対する屈曲制御性は含水させたものより大幅に改善した。前回の報告ではこの脱水 Selemion の屈曲性は Selemion 表面の銀メッキ層が印加電圧によって常に負極側の Selemion 表面に移動する為に引き起こされると説明した。しかし、更なる測定を行った結果、脱水 Selemion の屈曲には微量の水が Selemion に含まれていること、銀メッキ層の酸化還元反応が寄与している事が明らかとなった。そして実際に脱水 Selemion を用いることで微量の液体を組み上げるポンプを作製する事が出来た。更にこれまで報告した方法を駆使して Selemion を用いた可動台を作製する事が出来た。僅か+3V→-3V→+3V→-3V→…の矩形交流電圧下で 25 グラムのコインを載せたこの可動台を左右に繰り返し移動制御する事が可能となった。

# MWCNT functionalization

Iosif Daniel ROSCA<sup>a</sup>, Fumio WATARI<sup>b</sup>, Motohiro Uo<sup>b</sup>, Tsukasa AKASAKA<sup>b</sup>

- a. Department of Polymer Science, Faculty of Industrial Chemistry, Polytechnic University of Bucharest, Calea Victoriei, 149, Sector 1, Bucharest, Romania
- b. Hokkaido University, Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, 060-08586, Sapporo, Hokkaido, Japan

## 1. Introduction

Raw MWCNT, being a highly entangled product, is difficult to disperse uniformly in liquids or melts in order to efficiently carry the mechanical load or provide useful transport properties. Two different approaches to separate CNTs are usually used: physical methods and chemical methods. Physical dispersion methods include ultrasonication, ball milling, grinding and high speed shearing. Chemical methods use surfactants or functionalization to change the surface energy of the nanotubes to improve their wetting or adhesion characteristics and to reduce their tendency to agglomerate in the continuous solvent phase. Acid-treatment can result in short lengths in MWCNT. These shortened CNTs can modulate the properties of the CNTs including their dispersion properties. In various solvents functionalized CNTs are solvated as individual tubes, which makes possible to carry out further solution chemistry.

The present study investigates the oxidation of raw MWCNT in nitric acid and assesses the influence of different reaction conditions on the solubility and CNT loss.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Raw MWCNTs were purchased from NanoLabs. Nitric acid 60% was purchased from Wako.

### 2.2. Equipments

The oxidation was carried out in oil bath. The Raman shift of the CNTs during the oxidation was recorded by a Dilor spectrometer. The changes that occurred during oxidation were examined by SEM Hitachi S4000.

### 2.3. Method

In a two-necked round-bottomed flask 0.4g of raw MWCNTs and 40ml of nitric acid 60% were added. The mixture was sonicated for 30min at 35W and 35KHz. Next the reaction mixture was refluxed in an oil bath at 126°C for up to 48 hours. At a predetermined time 1ml of reaction mixture was extracted and added to 15ml of deionized water. The CNTs were washed twice and separated by filtration on polycarbonate membrane filter of 0.2µm pore size. The filtered samples were dispersed in 15ml deionized water with sonicator tip for 2min.

The Raman scattering of the samples was recorded using Ar<sup>+</sup> laser at 514.5nm and 30mW output power.

## 3. Results and discussions

### 3.1 Oxidation kinetics by Raman spectroscopy

As the oxidation affects the graphitic structure of the nanotubes the Raman spectrum changes accordingly. Fig.1 presents the Raman spectra of the raw MWCNTs. The two sharp Raman peaks namely G (Graphite) and D (Disorder) bands will be correlated to the oxidation kinetics.



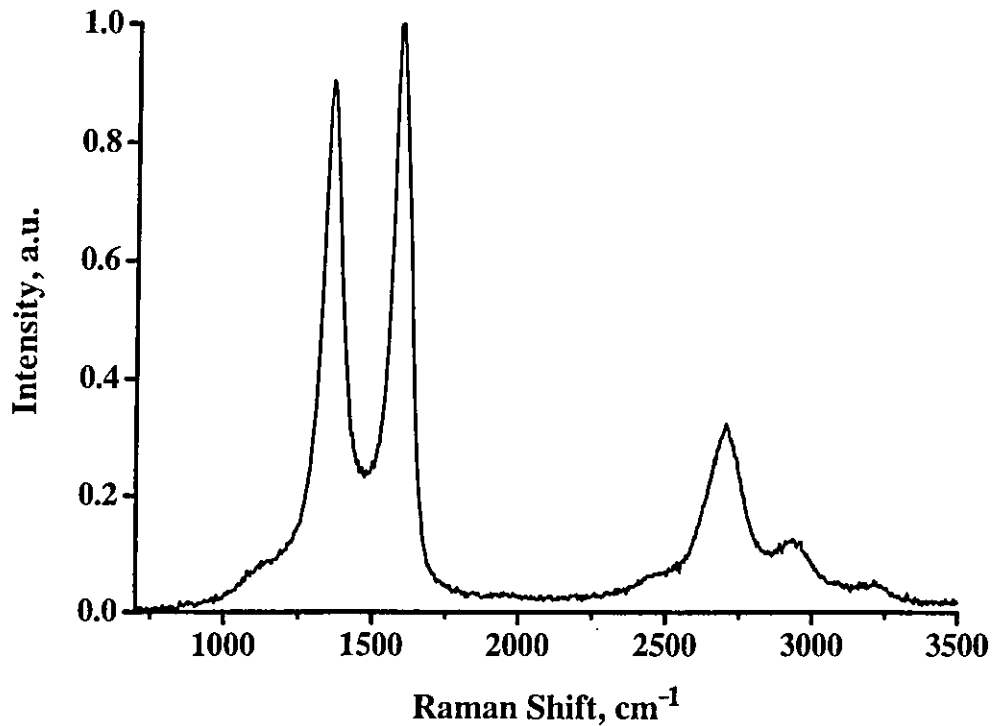


Fig. 1 The Raman spectrum of the raw MWCNTs

Using the peak fitting tool of Origin 7.0, the G and D band were fitted with the Lorentz function. It is clear from the fig.2 that there is a good correlation between the experimental and fitted data.

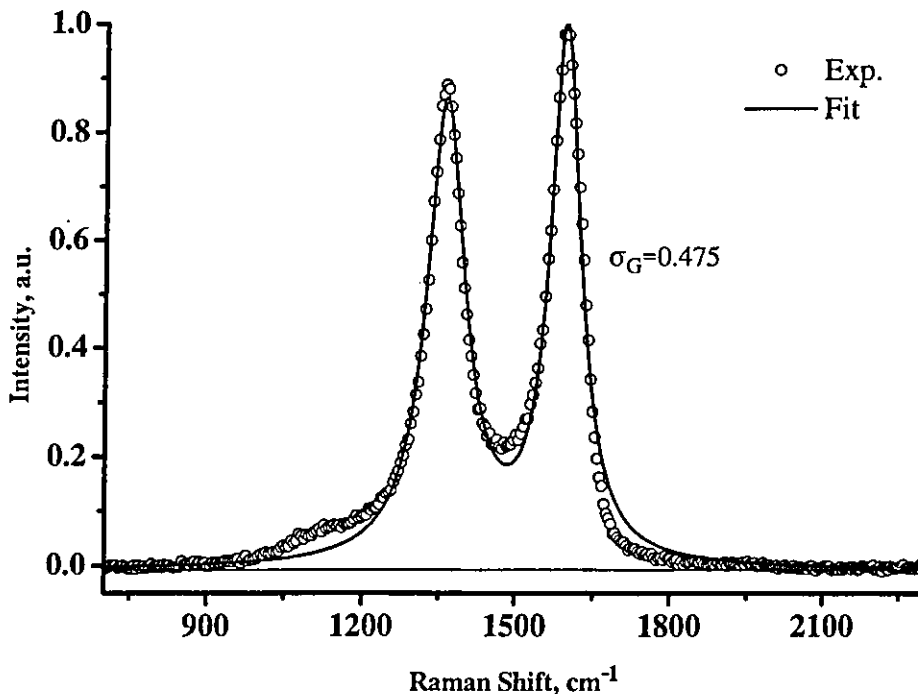


Fig. 2 Peak fitting and area-fraction of the G band for the raw MWCNTs

The peak fitting tool also integrates the peak areas, thus it is possible to monitor the change of the area under each peak during the oxidation process. The area-fraction of the G-band decreases as the oxidation advance (fig. 3). Mainly two processes contribute to the decrease of the area-fraction of the G band: (1) the formation of functional groups (carboxylic, carbonylic and phenolic); (2) the amorphous carbon structures generated from the disintegration of the CNTs contributing to the increase of the D band.

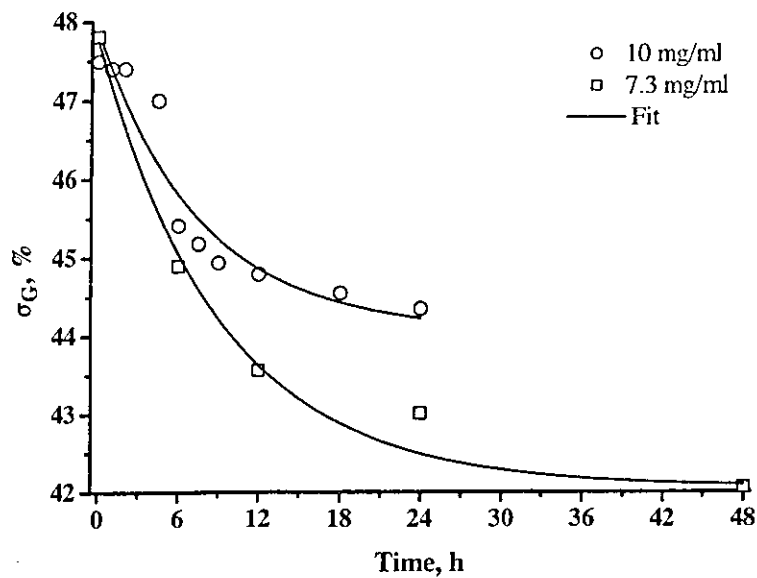


Fig. 3 Oxidation kinetics expressed as G band area-fraction  $\sigma_G$  vs. time

The oxidation rate depends on various parameters like: temperature, acid concentration, etc. In this study we observed that the oxidation rate depend also on the initial concentration of the CNTs.

Based on this method it is possible establish quantitative relationships between different process variables and the degree of oxidation.

### 3.2. Solubility assessment by photographic method

It is difficult to clearly separate the contributions on the G band mentioned above, but the visual observation of the solubility limit could be considered as a complementary criterion to establish the oxidation time that minimizes the loss of CNTs.

In order to have reasonable transparency, 0.2ml of the previous sample solutions were added to 8mL dionized water. The photographs corresponding to each sampling time is presented in fig. 4.

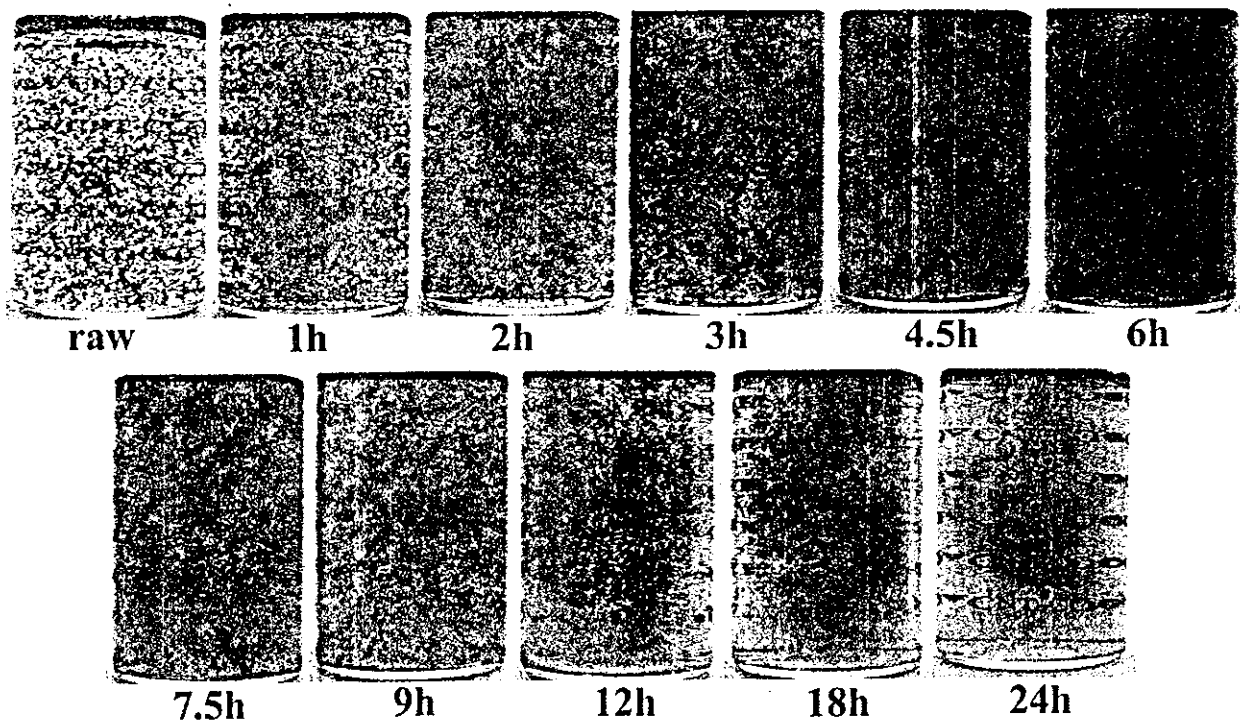


Fig. 4 Photographs of the raw and oxidized CNTs in water.

As the oxidation proceeds the solubility of the CNTs increases. After 4.5 hours of treatment there are sufficient functional groups to form a clear solution. As the oxidation goes further ( $t > 6h$ ) the transparency of the samples increases as the CNTs are continuously destroyed.

### 3.3. SEM observations

SEM micrographs at different time of oxidation are presented in figure 5. After 6 hours of acid treatment (fig 5b), the aspect of the MWCNTs are quit similar to that of the raw material (fig. 5a). After 24 hours (fig. 5c) it is noticed the presence of shortened CNTs and the disappearance of the CNTs with small diameter. Practically 75% of initial mass of nanotubes are destroyed after 24 hours of treatment. After 48 hours of oxidation, the nanotubes are strongly fragmented (fig 5d), and there are covered with amorphous carbon structures. In this case 90% of the nanotubes are lost.

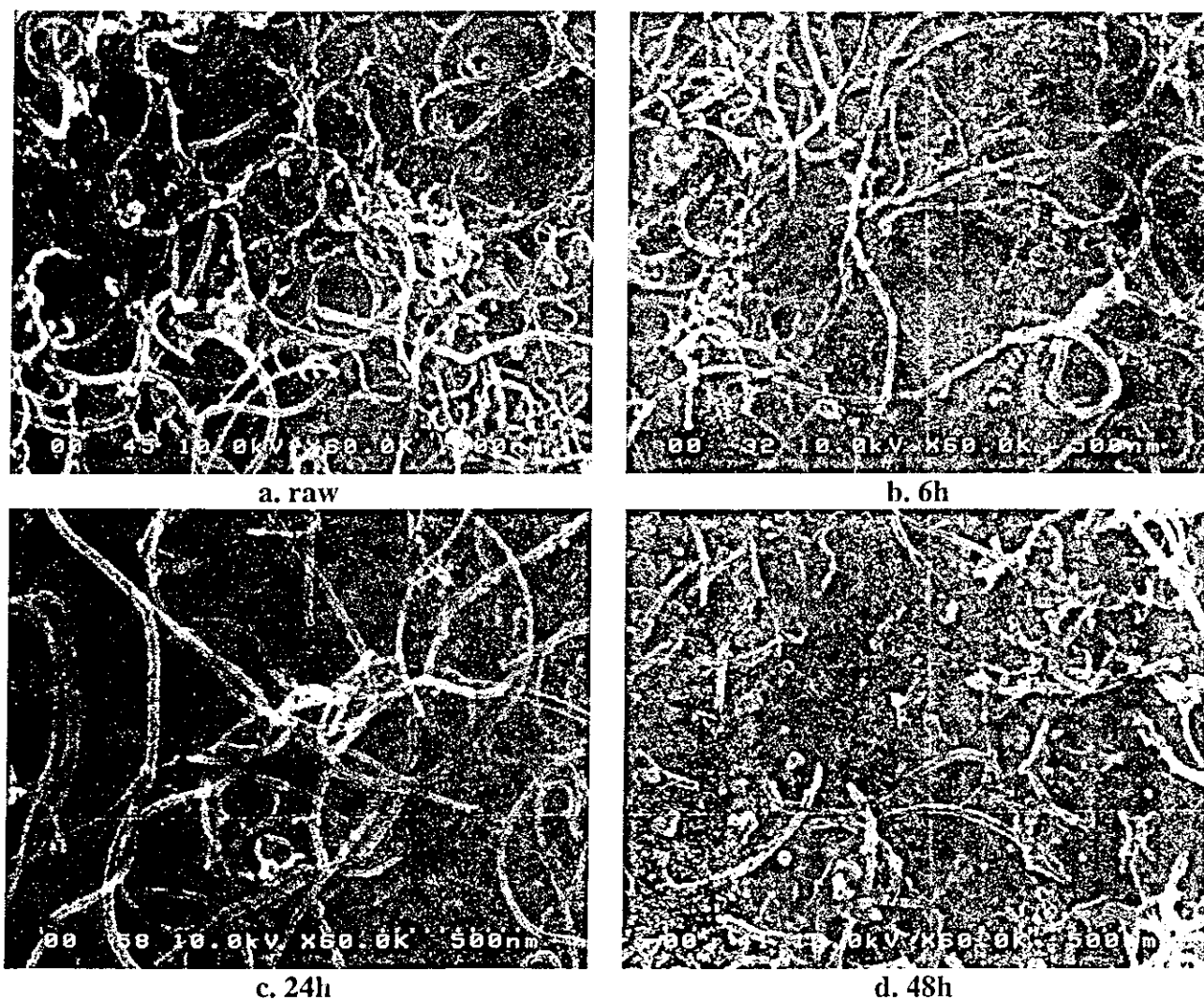


Fig. 5 SEM micrographs of the raw and oxidized samples

### 4. Conclusions

- Raman spectrometry is suitable for monitoring of the oxidation kinetics
- The area-fraction of the G band correlates well with the oxidation kinetics
- The Raman data correlated with the solubility test is convenient for establishing treatment time that provides good solubility and minimal CNT loss.
- The SEM micrographs show that in the early stages of oxidation the nanotubes keep their structures reasonably close to the raw material. After long oxidation ( $>24h$ ) the CNTs are strongly fragmented and covered with amorphous carbon structures.

# 磁性粒子を用いた温熱療法の基礎的検討

東北大学大学院環境科学研究科

渥美崇・○バラチャンドラン ジャヤデワン・佐藤義倫・田路和幸

東北大学大学院医学研究科

相場節也

## 1. はじめに

磁性流体ハイパーサーミアは、磁性粒子を目的とする腫瘍細胞に分散させ、十分な磁場強度と同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し、腫瘍細胞を加温して死滅させるという療法の一つである。磁性粒子を発熱体を用いることにより特定部分のみを確実に加温できるという利点があるが、生体への影響がないと考えられる磁場強度によって、癌細胞を死滅させるために十分な発熱量が得られる量の磁性粒子を腫瘍細胞に分散させることができるかが課題となる。

ハイパーサーミアの発熱体として用いる磁性粒子には、強磁性粒子、超常磁性粒子の2種類が考えられるが、それぞれに利点弱点が存在する。強磁性粒子の発熱量は、

$$P_{FM} = \mu_0 f \int H dM$$

と表され、体積あたりの総熱量=ヒステリシスの内部面積×周波数で求められる。ヒステリシスの内部面積は周波数の影響を受けないことから、周波数による発熱の制限がないという利点がある。つまり、発熱量は強磁性粒子の磁気特性に依存する。強磁性粒子の磁気特性は、微小構造、空孔、粒界、形状、大きさ、磁気異方性などに依存する。強磁性粒子で最大の発熱量を得るには、単結晶で均一な粒子を用いる必要があるが、実際にはすべての粒子を単結晶で均一にすることは難しく、理論的な発熱量の25%程度の発熱量しか得られない。

超常磁性粒子を、極性もしくは無極性の溶媒に分散させた磁性流体を用いた磁性流体ハイパーサーミアを用いた検討が近年盛んに行われている。超常磁性粒子を用いた場合についてはRosensweigらによって理論的な検討がなされ総発熱量は磁性ナノ粒子の材料、粒子径、周波数(f)に依存し、次式で表せることが分かった。

$$P_{SPM} = \mu_0 \pi f \chi'' H^2,$$

透磁率は複素数のかたちで表され( $\chi = \chi' + i\chi''$ )、周波数に依存する。また、外部からの磁場のエネルギーを内部エネルギーに変換して発熱を起こしている。

超常磁性粒子は、磁場強度、周波数の制御によって発熱量を調整できることから、強磁性粒子よりもハイパーサーミアへの利用に向いている。周波数と粒子径の関係から、ある周波数に対して緩和つまり発熱を起こす粒子は、最高の発熱効率を確認できる粒子径±数nmとごく限られた範囲の直径をもつ粒子に限られている。つまり、粒度分布の小さい粒子を用いることが発熱効率の向上に必要不可欠である。マグネタイトでは、計算結果から発熱効率が最も優れているのは300kHzにおいて直径13~14nm程度の粒子径であることがわかっている (Fig. 1 R. E. Rosensweig J. MMM 252 (2002) 370-374)。しかし、理論式から求められた発熱効率の最適粒子径についての実験的検証はなされて

いない。事実、様々な研究者が磁性流体ハイパーサーミアについて検討を行っているが、最高発熱効率が得られるマグネタイト粒子径は、それぞれの研究者により意見が異なっている。これは、マグネタイト粒子径について平均粒子径でしか議論がなされておらず、粒度分布、粒子物性についてまったく触れていないことによると考えられる。

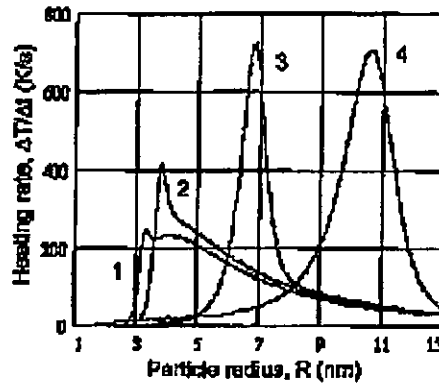


Fig.1. Comparative heating rate for various magnetic solids. 1-Barium ferrite, 2-Cobalt ferrite, 3-Magnetite, 4-Maghemite. (the volume fraction  $\phi=0.071$ , viscosity  $\eta=0.00235\text{kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $f = 300\text{kHz}$ , field intensity  $B=0.09\text{T}$ , surfactant layer thickness  $\delta=2\text{nm}$ ) (R.E. Rosensweig, JMMM 252(2002) 370-374)

### 3. 目的

本実験では、生体適合性がすでに認められていること、粒子径を様々な調整できること、分散技術が確立されていることなどから、マグネタイトを材料として選択した。マグネタイト粒子をハイパーサーミアへ適応するためにいくつかの粒子径を調整し、さらに粒度分布をできるだけ小さくした粒子を用意することを目的とした。理想としては、粒度分布が小さく、平均直径が13nm程度を代表に数nm刻みのマグネタイト粒子を得て、それらの違いが考察できればベストであるが、粒子径の調整方法の精度や実際の粒子径による発熱挙動の違いが顕著にみられるかどうか不明な点もあり、アルカリを変えた2タイプの粒子を用い、大きく粒子径を変えた場合について検討することとした。

### 3. 実験方法

直径13nm程度の粒子を得るには、共沈法が適していると考えられることから、共沈法によりマグネタイトを合成した後、界面活性剤としてオレイン酸を吸着させた。オレイン酸を吸着させた後、イソパラフィン系溶剤に分散させ、アセトンを用いて界面活性剤の反発力を調整することにより粒子わけを行った(佐々木 et al. 粉体および粉末冶金第49巻第2号、135-140, O. Perales, et al. Journal of Applied Physics, vol. 91, No. 10 参照)。

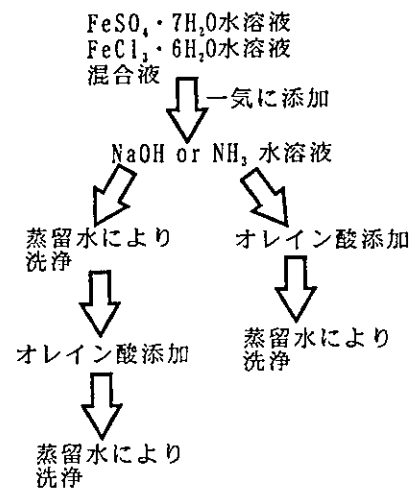


Fig. 2. Schematic of magnetite synthesis

実際の温熱療法にマグネタイトを使用する際には、水分散マグネタイトを用いる必要があるが、

本実験においては、発熱効率と粒子径について理論計算値と実験値の比較を行うことため、分散性に優れ、粒子わけが可能な非水系分散マグネタイト粒子を使用した。

### 3. 1 マグネタイト粒子合成

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を用いて、共沈法にてマグネタイトの合成を行った。塩基として、水酸化ナトリウム、アンモニアの2種類を用いた。マグネタイト粒子合成後、オレイン酸吸着を行った (Fig. 2 参照)。塩基として水酸化ナトリウムを用いた場合には、オレイン酸の吸着が不十分となるため、マグネタイト合成後に蒸留水による洗浄を行い、ナトリウムイオンを除去し、オレイン酸吸着を行った。オレイン酸吸着後の粒子は、イソパラフィン系溶剤に分散させた後、 $100^\circ\text{C}$ にて1時間加熱攪拌を行い、水を除去して磁性流体とした。水酸化ナトリウムを用いて合成した磁性流体を  $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4$ 、アンモニアを用いた磁性流体を  $\text{FT-Fe}_3\text{O}_4$  と呼ぶこととする。

### 3. 2 サイズ分級

イソパラフィン系溶剤ベースの  $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{FT-Fe}_3\text{O}_4$  に対して、アセトンを添加することにより、オレイン酸の長さが短くなるため、粒子間距離が短くなり界面活性剤の反発力が弱まり粒子径の大きいものから凝集を起こす。アセトン添加量を調整することにより、界面活性剤の反発力を調整した。まず上部と下部に分割し、Fig. 3の手順を繰り返してそれぞれを3つに分けた。最終的に  $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{NH}_3\text{-Fe}_3\text{O}_4$  をそれぞれ6つに分けた。  $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4\text{-TT}$ 、 $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4\text{-TM}$ 、 $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4\text{-TB}$ 、 $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4\text{-BT}$ 、 $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4\text{-BM}$ 、 $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4\text{-BB}$ 、と呼ぶこととする。  $\text{FT-Fe}_3\text{O}_4$  についても同様の呼び方とする。

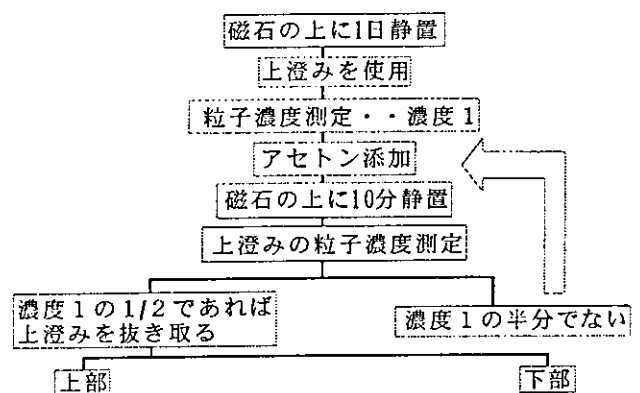


Fig. 3. Schematic of size separation system

### 4. 実験結果

共沈法を用いたマグネタイト合成に使用する塩基を水酸化ナトリウムとアンモニアの2種類とすることにより、平均粒子径、粒度分布の異なるマグネタイト粒子を合成した。水酸化ナトリウムを用いると、アンモニアを用いた場合に比べて粒子径が小さくなることは、経験的に言われていることであるが、その詳しいメカニズムはわかっていない。Fig. 4a、Fig. 5aを比較すると、水酸化ナトリウムを用いた場合は、 $10\text{nm}$ 以上の粒子数が少なく、平均粒子径も $10\text{nm}$ と、アンモニアを用いた場合の平均粒子径 $10.8\text{nm}$ より小さくなっている。

各試料を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察し、4箇所の写真撮影した。各写真から100個の粒子を任意に選択し粒子直径を測定した。1つの試料につき400個の粒子径を測定して、これを Fig. 4、Fig. 5に示した。また、平均粒子径、標準偏差、400個の測定粒子中、10個以上の含まれている粒子径の範囲をTable. 1に示した。  $\text{NaOH-Fe}_3\text{O}_4$  では、原液に比べるとサイズわけを行った試料の粒度分布は狭くなった。  $\text{FT-Fe}_3\text{O}_4$  は、FT-上上では粒子径が $4\text{nm}$ に集中している。その他の試料においても粒度分布は狭くなった。(Fig. 4、Fig. 5)

しかしながらいずれの試料でも、数nm刻みでの粒子わけはできていなかった。今回得られた試料をさらにサイズわけすることにより、数nm刻みの粒子わけが可能となると考えられる。

Table. 1 Diameter of particles

試料名	平均粒子径 (nm)	標準偏差	10個以上の粒子が存在する範囲 (nm)
NaOH-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MF	10. 0	3. 21	4-15
NaOH-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> TT	8. 04	2. 22	4-12
NaOH-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> TM	8. 83	2. 27	5-11
NaOH-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> TB	9. 76	2. 33	5-13
NaOH-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> BT	8. 64	2. 54	4-13
NaOH-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> BM	9. 78	2. 54	6-14
NaOH-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> BB	9. 64	2. 65	5-15
FT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MF	10. 8	3. 25	5-16
FT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> TT	6. 27	2. 10	4-10
FT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> TM	6. 51	1. 66	4-8
FT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> TB	10. 2	2. 68	5-15
FT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> BT	7. 06	1. 73	4-10
FT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> BM	9. 28	2. 57	4-14
FT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> BB	10. 7	2. 92	5-15

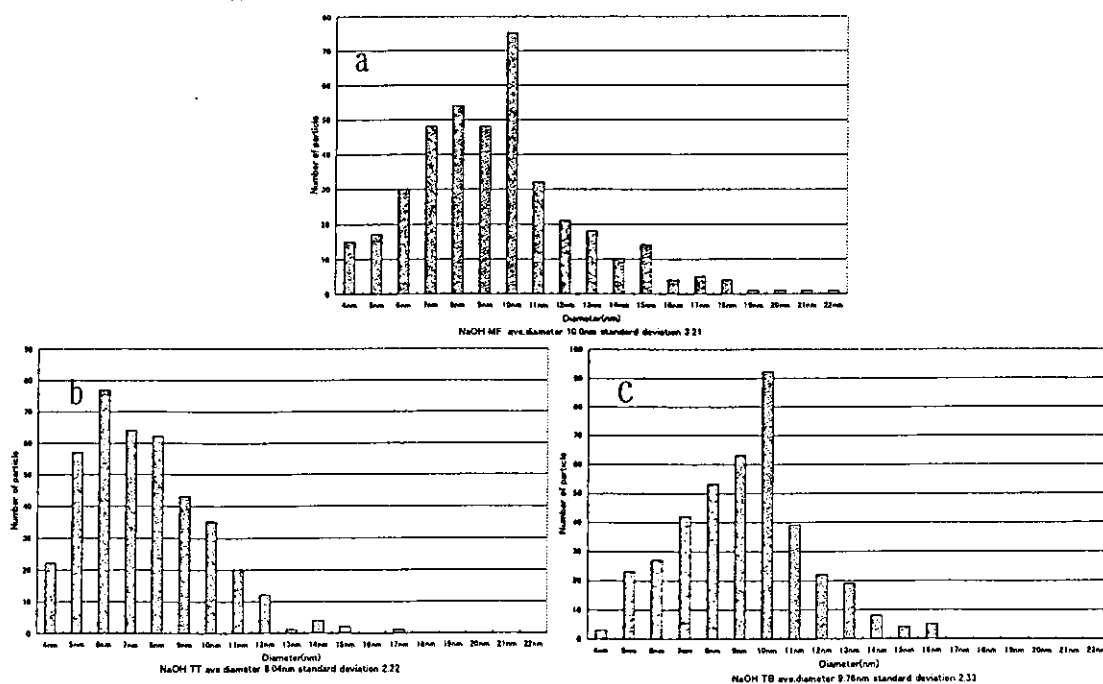


Fig. 4 Size distribution of NaOH-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

a: NaOH-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MF, b: NaOH-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> TT, c: NaOH-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> TB

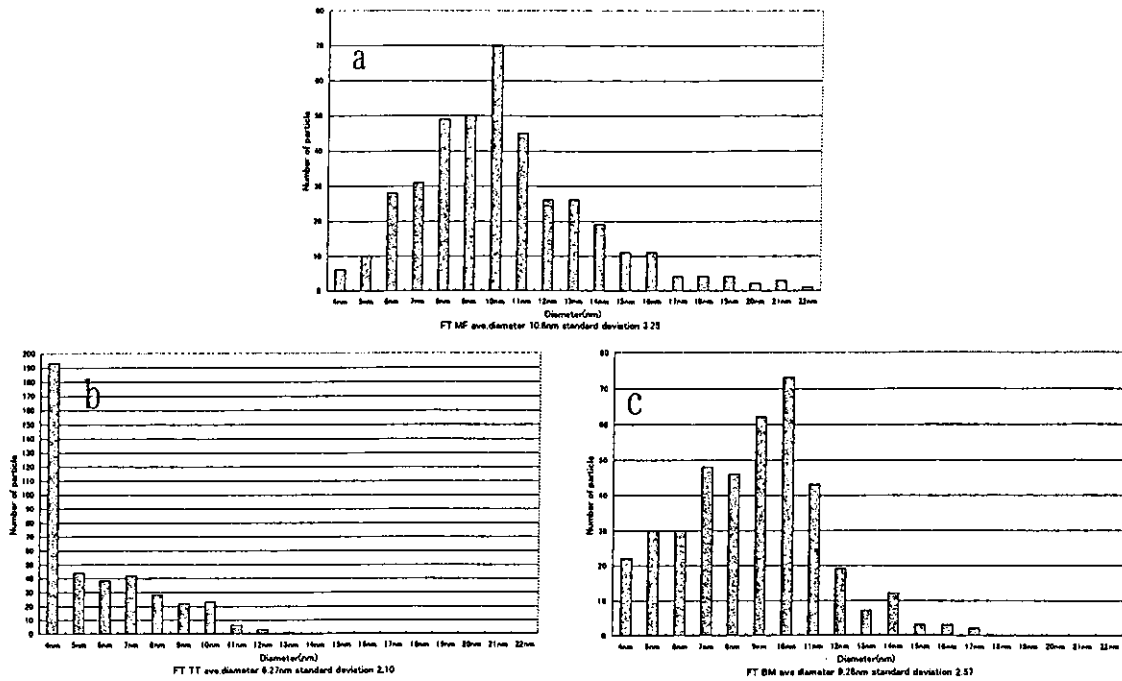


Fig. 5 Size distribution FT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
 a: FT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MF, b: FT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> TT, c: FT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> BM

### 5. ハイパーサーミア実験

発熱実験を行うため、交流磁場発生装置の設計を行なった。コイルの概観をFig. 6に、装置全体の概観をFig. 7に示す。コイルには、線径4mmの銅パイプを用い、布チューブにて被覆を行い、内径50mm、巻き数21回とし、冷却のため銅パイプ内部に水を流す。装置は、Signal Generator 8648C (HEWLETT PACKARD)、RF Power Amplifier GRF5052S (ASTECH Corp.)、Matching Box T020-5323A (THAMWAY)、Wattmeter (BIRD Electronic Corp.)から構成されている。周波数は150kHz~600kHz、電力は200Wである。装置の性能、マグネタイトの発熱の確認のため、マグネタイト磁性流体を用いた実験を行った。Fig. 8にマグネタイト磁性流体を用いた発熱の結果を示す。マグネタイト磁性流体（粒子濃度40.3wt.%）を30ml用いて実験を行った。使用したマグネタイトはFT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MFと同様の方法で合成したものである。今回の測定により、我々の使用する装置、マグネタイト粒子を用いることにより十分な発熱量が得られることが確認された。しかし、コイルに発生している磁場強度を計測することが出来なかったため、周波数により磁場強度が変化している可能性もある。磁場強度を測定しなければ各周波数での発熱効率を比較できないため、今後測定方法を検討する必要がある。

また、本装置を用いて今後、細胞実験、動物実験を行う予定である。



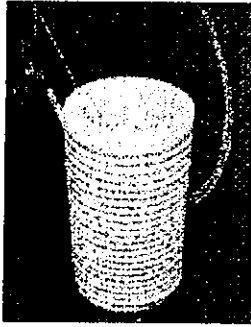


Fig. 6 Coil

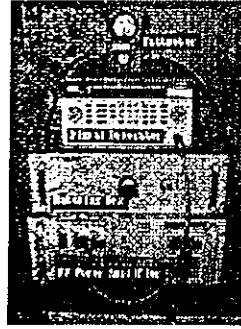


Fig. 7 AC Magnetic Field Generator

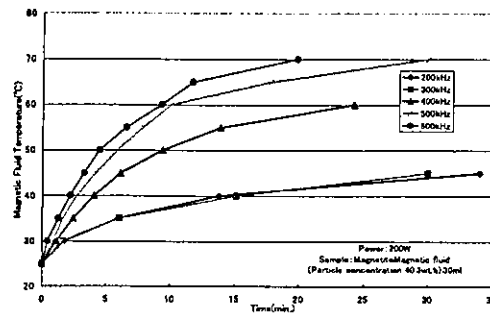


Fig. 8 Magnetic Fluid Temperature in AC-Magnetic Field

## 6. まとめ

本研究において、マグネタイトのサイズわけ、交流磁場発生装置の設計、マグネタイト粒子の発熱の確認を行った。

マグネタイト粒子のサイズわけに関しては、粒度分布を小さくした粒子を得ることが出来たが、目標とする数nm刻みでの粒子を得ることは出来なかった。しかし、今回サイズわけを行った試料を用いてさらなるサイズわけを行うことにより、数nm刻みでの粒子を得ることが可能であると考えられる。

交流磁場発生装置については、装置が完成し、マグネタイト粒子の発熱が確認された。今後、サイズわけを行ったマグネタイト粒子の発熱効率の周波数依存性や粒子濃度による発熱効率の変化などを測定することにより、マグネタイトの発熱機構の解明、発熱効率と粒子径の関係、磁気特性と発熱効率の関係など様々な検討を行うことが出来る。

## カーボンナノチューブ固化体の焼結と生体適合性

○王蔚、近藤英臣、横山敦郎、川崎貴生、宇尾基弘<sup>1</sup>、  
大川昭治<sup>1</sup>、赤坂司<sup>1</sup>、菅原敏<sup>1</sup>、亘理文夫<sup>1</sup>、大森守<sup>2</sup>  
北大院・歯・有床義歯補綴、<sup>1</sup>北大院・歯・歯科理工  
<sup>2</sup>東北大・金研

Fabrication of Sintered Carbon Nanotubes and their Properties  
W.Wang, H.Kondo, A.Yokoyama, T.Kawasaki, M.Uo, S.Ohkawa,  
T.Akasaka, T.Sugawara, F.Watari, M.Omori\*  
Hokkaido Univ. Graduate School of Dental Medicine  
\*Tohoku University Institute for Materials Research

### 【緒言】

カーボンナノチューブ(CNTs)は難焼結性であるが固化体ができれば様々な分野での構造材料として期待される。現在まで、放電プラズマ焼結(SPS)法を用いて、CNTsの固化を行ってきたが、CNTsに特有なチューブ状構造が保持可能な固化方法を見つけることは重要である。本研究ではポリカルボシラン(PCS)を結合材としてSPSを用いて作製した多層カーボンナノチューブ(MWCNTs)の機械的性質と生体適合性を検討した。

### 【材料および方法】

#### 1 試料作製

PCS粉末含有量が5、10、15、20、25wt%になるようにPCSを炭化水素溶媒n-ヘキサンに溶解後、MWCNTs(Nano Lab社製)を添加し、よく攪拌混合して、乾燥後、MWCNTsとPCSの混合粉末を得た。この混合粉末を10φ×50mmのグラファイト製モールドに充填し、放電プラズマ焼結装置(SPS-1050、住友石炭鉱業製)により、焼結圧力20,40,60,80,100,120MPa、焼結温度1200℃で焼結を行った。

#### 2. 嵩密度および気孔率および比表面積

MWCNT/PCS焼結体はチューブ状気孔がある固化体と考えられるため、比表面積を比表面積測定装置(flowsorb III SHIMADZU)を用いガス吸着法により測定した。

#### 3 固化体の分析

焼結体はラマン分光装置(Dilor-Jobin Yvon-Spex-Horiba LABRAM)および高出力X線回折システム(JEOL, JDX-3500)による分析および走査型電子顕微鏡(SEM/Hitachi S4000)と透過型電子顕微鏡(TEM/Hitachi 800)による観察を行った。

#### 4 生体適合性試験

焼結圧20MPaで、PCS含有量5%、25%で焼結した試料を1×1×5mmに切断し、8週齢ウィスター系雄性ラットの腹部皮下組織および大腿骨骨髄腔内に埋入した。軟組織に埋入した試料については、1および4週後に摘出し組織学的検索を行った。骨内に埋入した試料については4週後に摘出し研磨標本作製し検索した。対照として、未焼結

MWCNTs粉末、結合材を無添加MWCNTs固化体および炭化ケイ素を皮下組織に埋入し、1週後に摘出し組織学的に検索した。

### 【結果および考察】

焼結圧120MPa(PCS 5-25%)および焼結圧80, 100MPa(PCS含有量25%)では焼結後試料の崩壊が認められた。焼結圧20MPa(PCS 5-25%)、焼結圧40, 60MPa(PCS 25%)では経時的に安定であり崩壊は認められなかった。

各種条件下で固化した試料の比表面積はすべて59.5m<sup>2</sup>/g以上の高い値を示し、最大値は114.5m<sup>2</sup>/gであった。比表面積と開孔率が高い値を示したことから、固化焼結体はチューブ状構造を保持していると考えられる。

ラーマンスペクトルは、焼結条件によらず、1312cm<sup>-1</sup>と1555cm<sup>-1</sup>付近にMWNTのピークが検出され、2878cm<sup>-1</sup>付近にSiCのピークが検出された。

X線回折にも大きな差は認められず、MWCNTのピーク(2θ=26℃付近)とともにSiCのピーク(2θ=36, 60, 68, 72℃付近)も検出された。PCSが一部分解してSiCとなり、MWCNTの結合に寄与していると考えられる。

図1は焼結圧60MPa、PCS25%の固化体表面のSEM像でカーボンナノチューブは交叉的な排列が認められた。図2は20MPa、PCS25%の透過電子顕微鏡(TEM)像で焼結体はナノサイズのチューブ状構造を保持することが確認される。

軟組織埋入1週後、MWCNTs粉末や炭化ケイ素粉末では、試料周囲には肉芽組織が認められ、マクロファージが多数観察されたが、固化体周囲には細胞成分を含む線維性結合組織が観察された。PCS含有量が多いほうが周囲の炎症は強い傾向を示した。

本研究により、放電プラズマ焼結法によりポリカルボシランを結合材として多層カーボンナノチューブを固化する焼結条件が得られた。固化したMWCNT/PCSは、MWCNTsの特有なチューブ状構造を保持することが確認された。

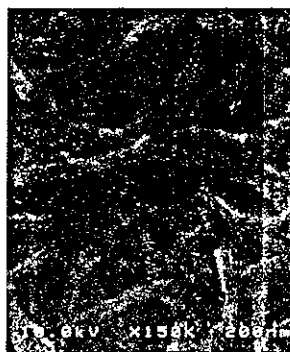


図1 MWCNT 焼結体(焼結圧60MPa、PCS25%)のSEM像

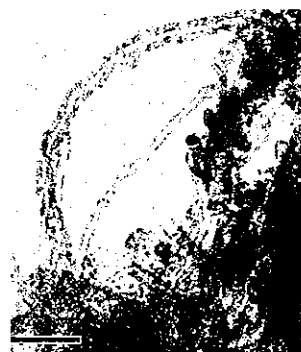


図2 MWCNT 焼結体(焼結圧20MPa、PCS25%)の透過電顕(TEM)像

# 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

衣斐美歩<sup>1)</sup>, 和田悟史<sup>1)</sup>, 佐藤義倫<sup>2)</sup>, 田路和幸<sup>2)</sup>, 山本松男<sup>3)</sup>, 張桂霞<sup>1)</sup>, 中島愛子<sup>1)</sup>  
和泉雄一<sup>4)</sup>, 高尾尊身<sup>3,4)</sup>, 飯田順一郎<sup>1)</sup>, 横山敦郎<sup>1)</sup>, 田村正人<sup>1)</sup>

北海道大学大学院歯学研究科<sup>1)</sup>, 東北大学大学院環境科学研究科<sup>2)</sup>,

鹿児島大学生命科学資源開発研究センター<sup>3)</sup>, 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科<sup>4)</sup>

## 1. 目的

ナノサイズの炭素材料であるカーボンナノチューブ・ナノファイバーを生体へ応用するためには、それらの生体への組織反応性とその反応の機構を明らかにすることが必須である。本研究では、ミニブタ由来歯根膜細胞株の細胞培養系を用い、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/マイクロ微粒子の細胞レベルにおける反応性を明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料と実験の方法

<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\_2 $\mu$ m\_cake\_CNFs\_040207a (田路研製)

e: PC\_0.4 $\mu$ m\_cake\_CNFs\_040207b (田路研製)

f: PC\_0.1 $\mu$ m\_cake\_CNFs\_040207c (田路研製)

### <方法>

#### 【歯根膜細胞株の樹立】

近年実験動物として注目されているクラウン系医用ミニブタを用い、クローン化した歯根膜由来細胞株を樹立した。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-neohTERT, 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細胞株を樹立した。

【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】

ミニブタ歯根膜由来細胞株TeSPDL-3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。この細胞を、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。

72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。また、細胞の機能に対する効果について、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（ALP）活性を、活性染色法を用いて測定した。

### 3. 結果

サイズ制御した多層カーボンナノチューブをTeSPDL-3細胞に添加し培養し、DNA合成を無添加のコントロールと比較した。ac\_size\_550nm\_NL2\_MW\_031126b を5 μl 加えたものではDNA合成量が増加した(0.01<p<0.05)が、それ以外では有意な変化 (p<0.05) を示すものはなかった。サイズ制御したカーボンナノファイバーでは、PC\_2μm\_cake\_CNFs\_040207aもしくはPC\_0.4μm\_cake\_CNFs\_040207bを25 μl 加えたものではDNA合成量が減少した(0.01<p<0.05)が、それ以外ではTeSPDL-3細胞の細胞増殖活性に有意な変化 (p<0.05) を示すものはなかった。

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のTeSPDL-3細胞のALP活性に対する作用については、現在検討中であり発表会で発表する予定である。



TeSPDL-3細胞