

ノチューブは原料に混入しおり、その割合は非常に少ない。20-40nm の大部分の多層カーボンナノチューブは塊で存在している。その破断面では多層カーボンナノチューブの引抜が観察される。この塊で存在している部分のTEM写真をFig.5に示す。50nm以下のハイドロキシアパタイト粒と多層カーボンナノチューブとがナノ複合化されている状態が観察される。これ以外の部分のハイドロキシアパタイト粒は2 $\mu$ mまで大きく成長している。このナノ複合が靱性の向上をもたらしていると考えられる。多層カーボンナノチューブの

6wt%添加までは、添加量が多くなるにつれて複合材料の靱性が大きくなっている。しかし、それ以上の添加では靱性が少し下がり一定値になる。その理由は、ナノ複合では多層カーボンナノチューブとハイドロキシアパタイトの間には分子間力の結合しか存在しないため、多層カーボンナノチューブの引き抜きが容易で、大きな破壊エネルギーを緩和できないためと推定される。しかし、破壊靱性の向上には効果的である。

靱性と残留応力のとの関係もそれぞれの材料によって異なってくる。一般的には、残留応力が多くなると強度と靱性も下がる。その理由は、クラックの発生によって残留応力が緩和できるためである。残留応力が少ないときには、クラックの進展を残留応力が阻止の方向に働くために靱性の向上も期待できる。多層カーボンナノチューブとハイドロキシアパタイトの間の熱膨張差は大きく、多層カーボンナノチューブの均一分散では、複合材料中に多くの残留応力が発生すると考えられる。しかし、ここで得られた複合材料では、ナノ複合部分とハイドロキシアパタイトのみの部分とからなり、均一分散ではない。ナノ複合では、微細のハイドロキシアパタイト粒が、異方性の大きい多層カーボンナノチューブで取り囲まれている状態になっている。ここでは、クラックが進展してきた時、ハイドロキシアパタイト粒が粒界で破壊するのを、多層カーボンナノチューブが阻止できる組織になっている。さらに、ナノ複合においては、

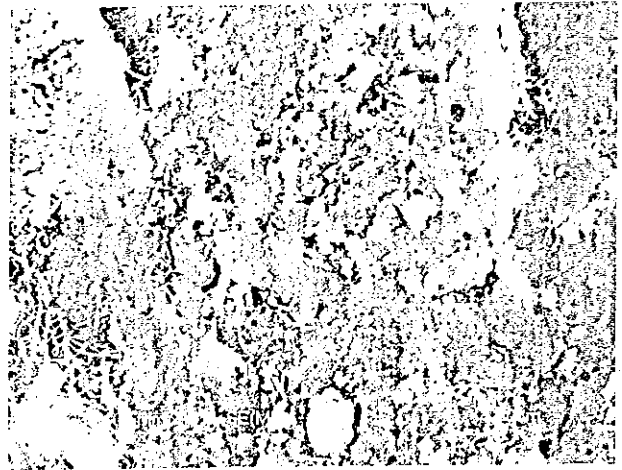


Fig. 4 SEM image of fracture surface of HA-6wt%MWNT composite.

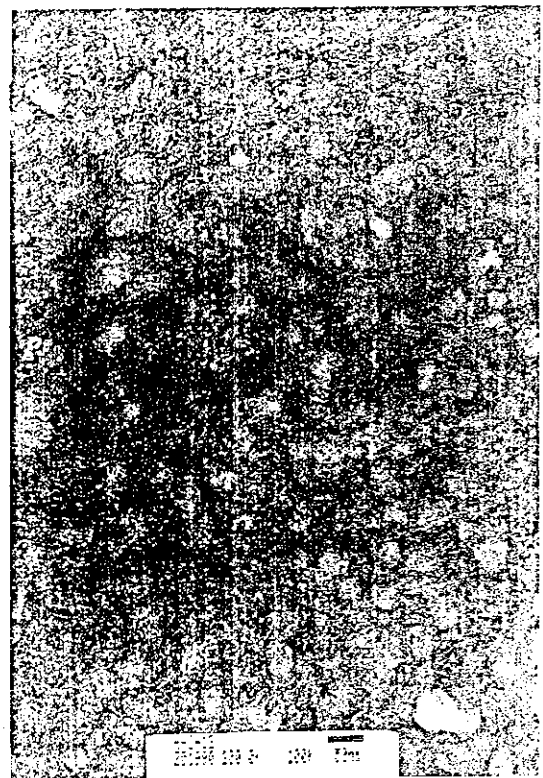


Fig. 5 TEM image of MWNT-hydroxyapatite nanocomposite.

ハイドロキシアパタイトの粒が小さいために、熱膨張差による残留応力も少なくなり、強度低下の影響が小さく、韌性を上げる効果が大きくなると推定される。このナノ複合は原料に 6 モルの  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  と 4 モルの  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  を使用することによって生成できたものであり、通常の  $0.5\mu\text{m}$  程度のハイドロキシアパタイト粉を原料に用いたのでは達成不可能である。

#### 4. まとめ

6 モルの  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  と 4 モルの  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、および多層カーボンナノチューブをスラリー状にして、公転・自転混合機を使って混合原料を作製した。この混合原料を放電プラズマシステム(SPS)にて、5-20MPa の加圧下で、 $1200^\circ\text{C}$ - $1250^\circ\text{C}$  の温度範囲で真空中あるいは  $\text{N}_2$  ガス中にて焼結した。得られた複合材料の組織はハイドロキシアパタイトと多層カーボンナノチューブがナノ複合化した部分と、マトリックスのハイドロキシアパタイトとから構成されている。ナノ複合は熱膨張差による残留応力を低減して強度低下を少なくし、韌性向上には大きな効果を発揮し、それによって多層カーボンナノチューブ添加は韌性の大きな生体複合材料の生成を可能にしている。

#### 文献

- (1) K. Park and T. Vasilos, "Characterization of carbon fiber-reinforced calcium phosphate composites fabricated by hot pressing", *J. Mater. Sci. Lett.*, 16, 985-987 (1997).
- (2) G. -D. Zhan, J. D. Kuntz, J. Wan and A. K. Mukherjee, "Single-wall carbon nanotubes as attractive toughness agents in alumina-based nanocomposites", *Nature Mater.*, 2, 38-42 (2003).
- (3) X. Wang, N. Padture and H. Tanaka, "Contact-damage-resistant ceramic/single wall carbon nanotubes and ceramic/graphite composites", *Nature Mater.*, 3, 539-544 (2004).
- (4) L. Zhao and L. Gao, "Novel in situ synthesis of MWNTs-hydroxyapatite composites", *Carbon*, 42, 423-426 (2004).

# カーボンナノチューブ固化体の作製と機械的特性の評価

東北大学大学院工学研究科

エネルギー安全科学国際研究センター

山本 剛・高橋 亨・大森 守・橋田俊之

## 1. 緒言

カーボンナノチューブ(CNTs)を生体材料として利用するためには、CNTsの生体適合性の評価とともに、人工関節や人工歯根などの生体インプラント材料への応用を目的とした、CNTバルク固化体の作製法の確立が不可欠である。この課題に対して著者らは、結合剤を使用せずに単層カーボンナノチューブ(SWCNTs)のみを、放電プラズマ焼結法(SPS法)を使用することによりSWCNT固化体を作製することに成功している。また、三点曲げ試験法を使用し、SWCNT固化体の作製条件が機械的特性に及ぼす影響の評価を行ってきた。しかしながら、固化体の破面からは、数十本で構成されるバンドルが一つのユニットとして引抜け挙動を示していることが観察されている。そのバンドルの直径は先端に近づくに伴い、細くなる形態を有しており、SWCNTsの破断は認められない。これは、依然としてSWCNTs間が結合力の弱いvan der Waals力で結合しているために、負荷に伴いSWCNTs間に滑り変形が生じたことを示唆している。また、破面には明確なバンドル構造とは異なる不定形な構造を有する物質も観察されている。これは、固化体の作製時におけるパルス状の電圧印加による高温度場の発生に起因して、SWCNTsに構造変化が生じ、不定形な構造を有する炭素質物質が生成したことが示唆される。従い、SWCNTsの有する軽量かつ高強度な特性を十分に生かした固化体の作製には、SWCNTsの構造を大きく損なうことなく、SWCNTs間ならびにバンドル間に強固な結合を導入する必要がある。

本報告では、SWCNTs間ならびにバンドル間に強固な結合を導入することを目的とし、出発原料に少量のPolycarbosilane (PCS) (10 mass%)を添加したSWCNTs-PCS混合粉の固化実験を行い、その機械的特性を評価した。また、SWCNTsの構造変化を避ける目的で、固化法にはホットプレス法を用いた。

## 2. 実験方法

本研究で使用したSWCNTsはアーク放電法で合成したものであり、燃焼酸化処理および塩酸を使用した酸処理にて精製処理を施したものである。PCSを溶解させたヘキサン中にSWCNTsを投入し、超音波により攪拌を行った。次に、SWCNTsを含む溶液を室温・大気下に保持しヘキサンの気化を行うことでSWCNTs-PCS混合粉を作製した。

固化体の作製にはホットプレス法を用いた。SWCNTs-PCS混合粉を内径20 mmのグラファイト製のダイスに投入し真空引きしたチャンバー内で上下ロッドを介し所定の圧力を負荷した。固化体の作製パラメータは、温度条件は1000, 1400および1800 °Cであり、圧力条件は120 MPaである。作製した固化体は直径20 mm, 厚さ1.5 mmの円盤状であり、これを研削機ならびに研磨紙を用いて2×1×18 mmの短冊状に調整し、試験に供した。上述したPCS添加の影響を検討する目的で、PCS未添加の固化体を作製し、同

様に試験に供した。

機械的特性評価には、三点曲げ試験法による破壊特性評価を用い、縦弾性係数および破壊強度の評価を行った。試験時におけるパンチャーの移動速度は0.05 mm/minとした。縦弾性係数 $E_b$ ならびに破壊強度 $\sigma_b$ は下記に示す式を用いて評価した。

$$E_b = \frac{1}{4} \cdot \frac{E}{bh^3} \cdot \frac{P}{\delta} \quad (1)$$

$$\sigma_b = \frac{3P_b L}{2bh^2} \quad (2)$$

ここで $L$ は支点間距離 (= 16 mm),  $b$ は試験片の幅 (= 2 mm),  $h$ は試験片の厚さ (= 1 mm),  $P/\delta$ は荷重-荷重線変位曲線における初期線形域の勾配,  $P_b$ は最大荷重である。一つの作製条件につき3個の試験片を評価し、縦弾性係数および破壊強度の平均を求めた。これ以降、PCSを添加して作製した固化体をSWCNT-PCS固化体、未添加のものをSWCNT固化体と言及する。また、ラマン散乱測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) ならびに透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた微細構造評価ならびに破面観察を行い、破壊プロセスの評価を行った。

### 3. 結果および考察

三点曲げ試験により得られた荷重-荷重線変位曲線を、SWCNT-PCS固化体 (SWCNT-PCS composite) およびSWCNT固化体 (Binder-free SWCNT solid) として図1(a)-(c)に示す。作製温度はそれぞれ、(a) 1000 °C, (b) 1400 °C および(c) 1800 °Cである。いずれの作製条件においても負荷の初期段階における挙動は弾性変形を示していることがわかる。1000 °Cで作製した試験片はいずれも最大荷重に至るまで著しい非弾性変形を呈している。荷重が最大荷重に達した後に急激に降下していることから、き裂が急速に進展したことが推察される(図1a)。1400 °Cで作製した試験片は1000 °Cのものに比べ、いずれの試験片においても最大荷重は高い値を示している。また破壊挙動は

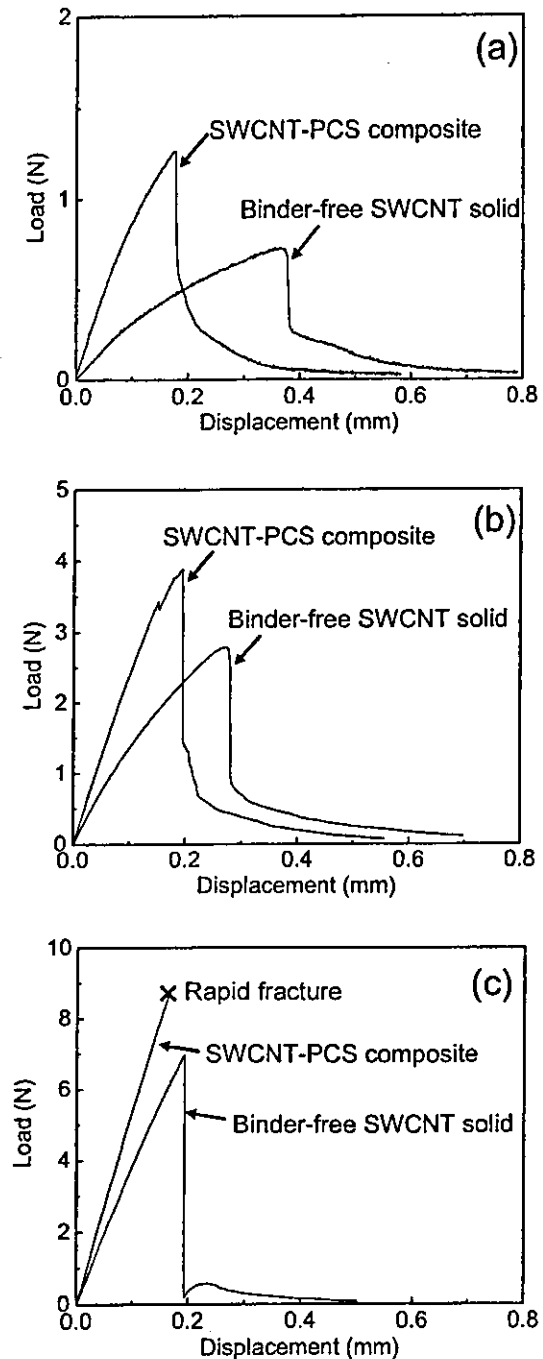


Fig. 1 Typical load vs. load-line displacement of the SWCNT-PCS composites and the binder-free SWCNT solids prepared at (a) 1000 °C, (b) 1400 °C and (c) 1800 °C, respectively.

Table 1 The processing conditions and the physical and mechanical properties of the SWCNT-PCS composites and binder-free SWCNT solids.

Materials	Processing temperature (°C)	Bulk density $\rho$ (Mg/m <sup>3</sup> )	Young's modulus $E_b$ (GPa)	Fracture strength $\sigma_b$ (MPa)
Binder-free	1000	1.39	2.0	11.6
Binder-free	1400	1.54	7.5	34.8
Binder-free	1800	1.70	19.6	89.3
SWCNT-PCS	1000	1.56	9.0	28.3
SWCNT-PCS	1400	1.62	12.8	56.4
SWCNT-PCS	1800	1.81	28.8	113.9

1000 °Cのものと同様に、最大荷重後、急激に低下するものの最終破断には至らず、若干の荷重保持能力を有していることから準脆性材料に分類されよう。しかし、作製条件が1800 °Cに上昇すると、その挙動は線形の様相を呈し、最大荷重後は、急激に荷重が低下していることから脆性的に破壊が生じたことが観察される。図1に示されるように、固化体の剛性ならびに強度は作製温度の増加に伴い高くなることが認められる。また、同じ作製条件ではSWCNT固化体に比べSWCNT-PCS固化体では高い強度が得られている。

表1に嵩密度、縦弾性係数および破壊強度を示す。嵩密度は、いずれの作製条件においてもSWCNT-PCS固化体に高い値が得られている。また、作製温度の増加に伴い縦弾性係数ならびに破壊強度は増加し、その値はSWCNT固化体と比べSWCNT-PCS固化体に高い値が得られている。この機械的特性の向上は、PCSを添加したことに起因するSWCNTs間ならびにバンドル間に結合が形成した可能性を示唆している。

図2に本研究で得られた結果と、これまでに得られている結果の比較を示す。ここで、(a) は縦弾性係数の比較であり、(b) は破壊強度の比較である。これまでに得られている結果はすべて、固化方法にSPS法を使用していること、また固化体の作製はいずれも加圧力に120 MPaを使用していることを付記しておく。PCS未添加の固化体では、いずれの作製条件においてもSPSを使用し作製した固化体に高い縦弾性係数および破壊強度が得られていることがわかる。一方、PCSを添加した固化体は、い

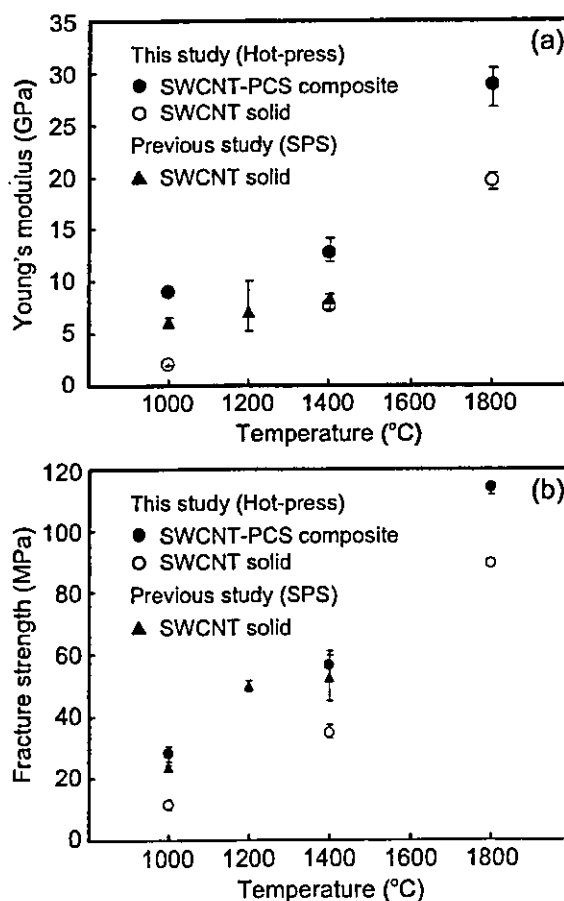


Fig. 2 A comparison of the this results (hot-pressed specimen) and previously reported results. (a) Young's modulus and (b) fracture strength.

ずれの作製条件においても、最も高い値を示していることから、PCS添加が固化体強度の発現因子となっていることがわかる。

次にSEMおよびTEMを用いた破面の観察結果について記述する。図3 (a), (b) にSWCNT固化体、および (c) にSWCNT-PCS固化体のSEM写真を示す。1000 °Cで作製したSWCNT固化体 (図3a)では、多数のバンドルが破面から引抜けを生じていることが認められる。破面の形態から、試験時における固化体の変形ならびに破壊に伴い、バンドルの引抜けが生じたことが推察される。引抜けを生じたバンドルは、長いもので約8  $\mu\text{m}$ を有していた。このバンドルの引抜け挙動は図1(a)および(b)で観察されている、最大荷重後の破壊挙動に関係しているものと推察される。TEM観察から、引抜けを生じたバンドルの直径は10-20 nmを有しており、SWCNTsの破断は観察されていない。一方、作製温度が1800 °Cまで上昇すると、上述した引抜け挙動を有する領域が減少していることに加え、多数のバンドルとは構造の異なる物質が観察されている (図3b)。この構造の異なる物質は、これまでにSPS法を用いて固化試験を行った試験片から認められている物質と極めて類似していることから、高温環境下におけるホットプレスに起因し、SWCNTsの構造変化により生じた物質と推察される。次に、SWCNT-PCS固化体における破面の観察結果について記述する。1000 °Cで作製したSWCNT-PCS固化体 (図3c) からはSWCNT固化体の破面で観察

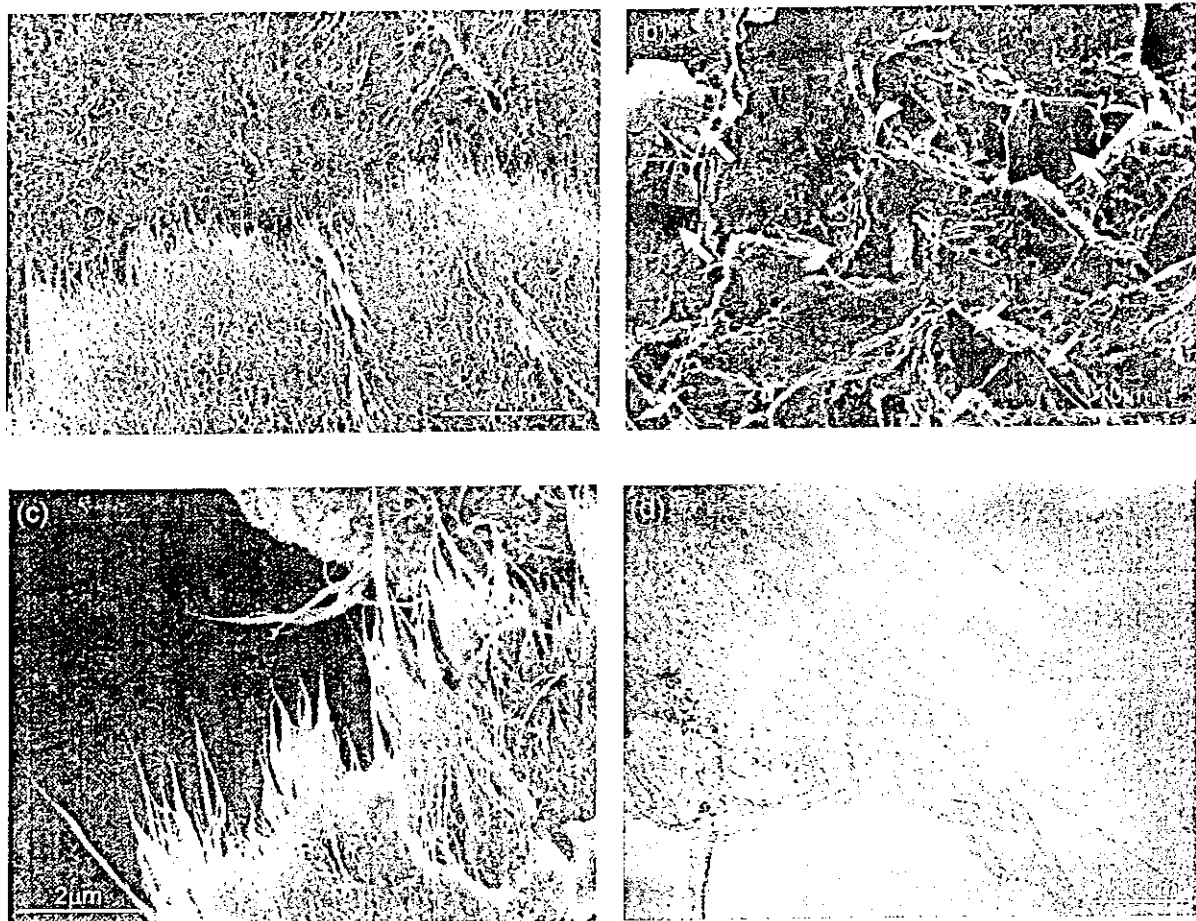


Fig. 3 Typical SEM and TEM photographs of the fracture surface for the (a, b) SWCNT solids and (c, d) SWCNT-PCS composites, respectively.

されているバンドルと比べ直径の大きいバンドルの引抜け挙動が観察されている。TEMによる観察結果から、このバンドルは30-100 nmの直径を有し、数本のサブバンドルから形成されていることが観察されている (図3d)。このサブバンドルはSWCNT固化体の破面で観察されているバンドルと類似した直径を有していることから、PCSの添加によりバンドル間に結合が形成されたものと推察できる。また、このPCS結合に起因してSWCNT固化体に比べ高い機械的特性が得られたものと考えられよう。1800 °Cで作製したSWCNT-PCS固化体の破面は、同条件で作製したSWCNT固化体と同様な様相を呈しており、バンドルと構造の異なる物質が多く観察されている。

作製温度が固化体のナノ構造の変化に及ぼす影響の検討を行った。ラマン散乱測定により得られた強度比 $I_G/I_D$ と作製温度の関係を図4に示す。なお $I_G/I_D$ は、これまでの実験により得られている、室温下で作製した機械的圧搾 (120MPa) のみによる圧密体における測定結果を用いて規格化を行ったものである。ラマン散乱測定においては、機械的特性の評価に供した固化体を乳鉢にて粉末状にしたものを使用した。同図にはこれまでの実験により得られているSPSを用いて作製したSWCNT固化体の $I_G/I_D$ も付記している。図4から明らかなようにPCS添加の有無に関わらず、固化体の作製温度の増加に伴い $I_G/I_D$ が低下する傾向は、これまでに得られている実験結果と同様な傾向である。この結果は、固化体に含まれるSWCNTsの割合が、作製温度の増加に伴い低くなることを示している。SWCNT固化体では、SWCNTs間がvan der Waals力より強固な結合である $sp^3$ 結合に遷移した結果、バンドル構造とは異なる物質が生成したことが示唆される。バンドル構造の一部または全域が $sp^3$ 結合することによりSWCNTsの滑り変形が抑制され、強度発現因子の一つになっているものと推察される。本研究で作製した固化体の $I_G/I_D$ は、SPSで作製した固化体の $I_G/I_D$ に比べ高い値が得られていることから、SWCNT構造をより保ったまま固化体の作製に成功している。例えば、ホットプレスにて1000 °Cで作製した固化体の $I_G/I_D$ 値は、SPSにて約700 °Cで作製した固化体と同様な $I_G/I_D$ 値であった。一方、SWCNT-PCS固化体ではSWCNT固化体に比べ、すべての作製条件下において $I_G/I_D$ は低い値を示しているが、 $I_G/I_D$ の温度依存性はSWCNT固化体と同様な傾向が認められている。しかしながら、SWCNT-PCS固化体の $I_G/I_D$ がSWCNT固化体に比べ低い値を示す要因は明らかではない。

#### 4. 結言

本報告では、SWCNTs間ならびにバンドル間に強固な結合を導入することを目的とし、SWCNTsに少量のPolycarbosilane (PCS) (10 mass%)を添加したSWCNT-PCS固化体を作製し、三点曲げ試験法を用いて機械的特性の評価を行った。実験結果よりSWCNT-PCS固化体の機械的特性は、未添加の固化体に比べ極めて高い特性を有する固化体の作製に成功している。1800 °Cで作製した固化体の縦弾性係数および破

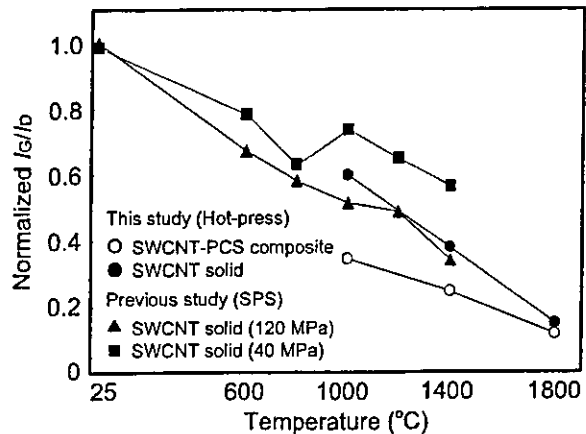


Fig. 4 Normalized Raman intensity ratio of the SWCNT-PCS composites and SWCNT solids.

壊強度は28.8 MPaならびに113.9 GPaであった。しかしながら、固化体の破面観察からは、先端が細くなる形状を有するバンドルの引抜け挙動が依然観察されていることから、SWCNT-PCS固化体の破壊メカニズムはバンドル間の滑り変形が支配的であると推察される。また、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。



# The preparation and biocompatibility research on a novel nano-hydroxyapatite/collagen based composite

Susan Liao\*, Fumio Watari, Motohiro Uo, Shoji Ohkawa, Tsukasa Akasaka,  
Kazuchika Tamura, Wei Wang, Fuzhai Cui

## Introduction

Hydroxyapatite (HA) has been extensively used in medicine for implant fabrication and is one of the most compatible materials owing to its similarity with mineral constituents found in hard tissue (i.e. teeth and bones).<sup>1</sup> Among the variety of HA based ceramics, carbonated HA (CHA) appears to be an excellent material for bioresorbable bone substitutes. Many experiments show the high solubility of carbonated apatite in vitro and in vivo. Since the HA phase present in natural bone, dentin and enamel, respectively, contains approximately 7.4, 5.6, 3.5 wt% of carbonate,<sup>4</sup> CHA materials have excellent biocompatibility and properties, which can be favorably compared with those of hard tissue. hydroxyapatite and collagen (COL) are the two mainly components in hard tissue. Then we design one biomimetic synthesis method of one ideal material (nCHAC) which show some features of natural hard tissue in both composition and the microstructure.

## Materials and Methods

Type I atelocollagen gel (Koken Company, Japan) (1# 2.5g or 2# 5g) was added to 0.5M acetic acid. Then solution of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  (Ca/P=1.66) and  $\text{CO}_3^{2-}$  (mol ratio of  $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ =0, 1, 3, 5, 6.7, 8.3, 10) were gradually added separately through respective tube pumps, and titrated at room temperature with sodium hydroxide to pH9. After aged the solution for 24h, the nCHAC material was harvested by centrifugation and freeze-dried. The carbonated weight percentage measured by Rigaku Thermoflex TG8110/TAS100. X-ray diffraction (XRD) analysis was performed in Rigaku/Multiflex diffractometer using CuK radiation and analyzed by the MDI JADE6 software.

Combined with PLGA, the nCHAC/PLGA membrane was prepared. Osteoblastic MC3T3-E1 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS under standard cell culture conditions. The osteoblasts were seeded into the PLGA, nCHAC/PLGA and blank control in 24-well dish at a concentration of  $0.67 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>.

## Results and Discussion

Thermogravimetric analysis (TGA) has been successfully pursued for analysis of different bone samples where water, soft tissue, and mineral phase could be quantitatively determined as Fig 1 shown. In addition, we use it to quantify the amount of carbonate in the nCHAC composite. The carbonated percentage gradually

increased with the adding amount in the solution whether high or low collagen component in the composite, especially on the range from 8-10 mol ratio. At the 1#, the highest carbonated percentage is 14.7%, which is high than that of CHA with other preparation method. The possible reason is the more nucleation sites during the collagen mineralization.

The X-ray diffraction results demonstrated that the broadening peaks similar to the pattern of natural dentine as Fig. 2 referred. Then we used the JADE analysis software to measure the mineral crystal size by Scherrer equation. The crystal sizes of nCHAC(2#) with high collagen were all lower than that of 1# with low collagen. Up to now, there is no report on the relationship between the mineral and the collagen addition in biomimetic HA/COL based composite. However there is no significant difference in the crystal sizes among the different carbonate addition. By variation of the addition rate and the temperature, it was possible to prepare samples with different crystal parameters, including the crystallization degree and crystal size.

During the one week culture with MC3T3-E1 cells, there is no significant difference between the nCHAC/PLGA group and PLGA group both in cell account and total protein assay.

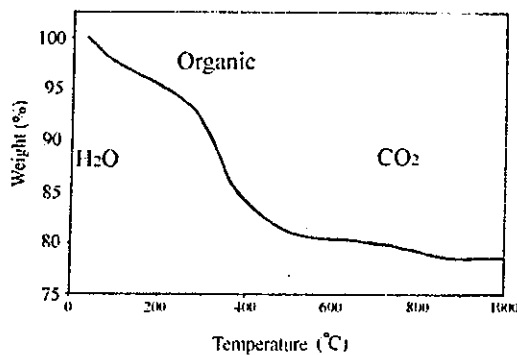


Fig 1 TGA of the nCHAC composite.

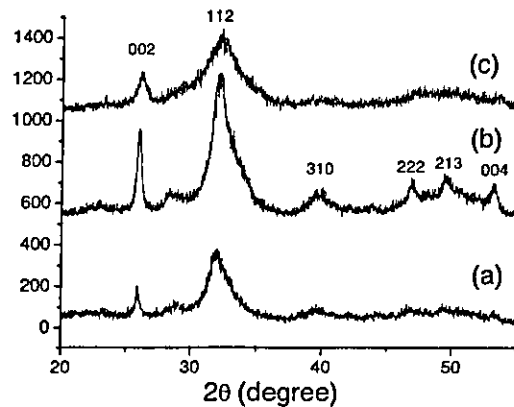


Fig 2. XRD of (a) natural human dentine  
(b) 1# nCHAC composite  
(c) 2# nCHAC composite

## Conclusion

On this study, the new mineralized collagen based composite, nCHAC material, was prepared, which is one of the most promising materials for hard tissue repair. This composite contained certain carbonated content and nano-HA minerals. Moreover, the CHA combined with collagen fibrils by self-assembly method, which mimics the component and microstructure in natural bone. Based on this research, it is possible to attain the proper type of nCHAC by control the reaction condition, when implanted in the different defect sites in hard tissue. The cell culture experiments demonstrate that the nCHAC/PLGA membrane has high biocompatibility.

メッキ層原子構造変化による脱水 Selemion の屈曲  
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

イオン交換膜、特に Selemion(旭硝子)と呼ばれるイオン交換膜群の一つであるカチオン交換性の Selemion は表面に銀メッキを施し脱水を行う事で、印加電圧に対し極めて優れた屈曲応答性を数時間以上の長時間に渡り示す。この高精度の屈曲応答性には Selemion に含まれる微量の水と印加電圧による銀メッキ層の酸化還元が寄与している事がこれまでの研究から示唆されていたが、その詳細な屈曲メカニズムは明らかとはなっていなかった。

今回、東北大学田路研究室の協力の下、XRD を用いた測定を行い、Selemion 表面に形成された銀メッキ層が実際に印加電圧によって酸化還元反応を起こし、正極側では  $4\text{Ag} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{Ag}_2\text{O}$  の反応が引き起こされ酸化銀が生成し、負極側では  $2\text{Ag}_2\text{O} \rightarrow 4\text{Ag} + \text{O}_2$  の反応により酸化銀が還元され、銀が生成している事が明らかとなった。このことから正極側では銀が酸化銀に変わる事で体積が増え、負極側では酸化銀が銀になる事で体積減少となり、結果として負極側へ屈曲すると考えられた。

Selemion 表面にメッキにより銀層を付与するのではなく銀の薄膜を圧着により付与した試料を作製し、その屈曲挙動を調べた。銀薄膜の酸化還元が引き起こされている事は、ほぼ確認できたが、メッキにより銀層を付与したものと異なり屈曲は引き起こされなかった。これはメッキを用いた場合は銀が Selemion の分子鎖間にまで浸透する事で酸化還元による銀の体積変化が Selemion 分子鎖間距離に変化を引き起こす作用を持つ一方、銀薄膜は Selemion 表面に乗っかっているだけで、その分子鎖間には浸透しないので、その酸化還元は Selemion 分子鎖間距離に影響を与える事が無い為と考えられた。

以上の事からメッキ銀層の酸化還元による体積変化が Selemion 分子鎖間距離に変化を与える事で Selemion の屈曲が引き起こされると結論した。

# 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

東北大院環境科学  
渥美崇、B. ジャヤデワン、佐藤義倫、田路和幸  
北大院歯学  
田村一央  
東北大院医学  
相場節也

## 1. はじめに

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<sup>1-6</sup>、特に磁性流体ハイパーサーミア (Magnetic Fluid Hyperthermia:以降MFHと省略) 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) 磁性ナノ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ナノ粒子の存在する部位のみを加熱することが可能、などが上げられる。もっとも大きな利点は、3) に示したように磁性ナノ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ナノ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なことである。一方、腫瘍細胞を十分に加熱することが可能な量の磁性ナノ粒子を腫瘍細胞内に分散できるかが課題となる。

MFHのさらなる発展のためには、MFHに最も適したフェライトナノ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ナノ粒子の物性について十分な議論がなされてきたとは言いがたい。

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

また、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ない、本装置を用いて磁性流体の発熱測定を行った。さらに、理論式により求められたフェライトナノ粒子に必要なとされる物性を満たす粒子の合成を行った。

## 2. 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、Rosenzweig<sup>7</sup>らの論文を参照した。

### 2.1 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。

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

$$\chi_0 = \chi_i \frac{3}{\xi} \left( \coth \xi - \frac{1}{\xi} \right), \quad \xi = \frac{\mu_0 M_d H V_M}{kT}, \quad \chi_i = \frac{\mu_0 \phi M_d^2 V_M}{3kT}, \quad V_M = \frac{4\pi R^3}{3}$$

$V_H = (1 + \delta/R)^3 V_M$   $\phi$  : 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

### 2. 3 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。

### 2. 4 各因子の計算結果

Fig. 1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. 1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15nm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11-13nm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11-13nm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8nm以下の粒子は発熱にほとんど関係しておらず、直径8-15nm程度の粒子のみが発熱に関係していることがわかった。

### 2. 5 理論解析のまとめ

理論式を用いて、発熱率、最適粒子径などの検討を行った。マグネタイト粒子を用いた場合、発熱には粒子径が非常に大きな影響を及ぼすことがわかった。8nm以下の粒子では、発熱がほとんど起こらず、11-13nmの粒子において最も高い発熱量が得られることがわかった。

MFHにおいて、少ない磁性ナノ粒子使用量で腫瘍細胞を死滅させるのに十分な発熱量を得るためには、直径8nm以下の粒子の除去、11-13nm粒子の増量が必要であることがわかった。

## 3. マグネタイト粒子のサイズ分級

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。そのためには、直径8nm以下の粒子の除去、11-13nm粒子を主とした磁性流体の製造が必要となる。

直径11-13nm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<sup>8</sup>。

### 3. 1 磁性流体作製

500ml ビーカーに27%アンモニア水200ml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0.5mol/l水溶液と $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の1mol/l水溶液を100mlずつ用いて作製した200mlの混合液を一

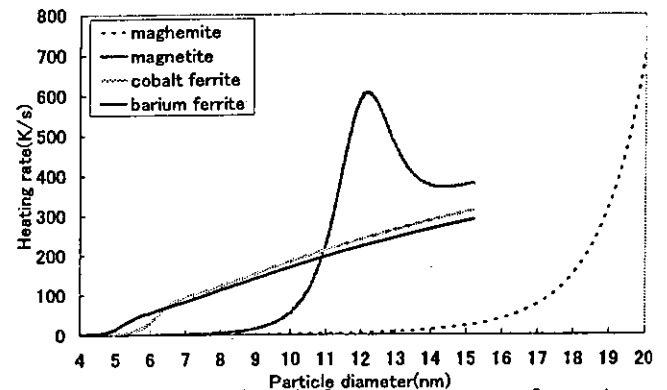


Fig.1 The calculated heating rate of various magnetic material as function of particle diameter ( $f=300$ ,  $H_0=0.01$  T= $300$   $\delta=3.2$   $\phi=0.071$   $\eta=0.000858$ , 磁性流体の飽和磁化は396 Gとする。)

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 30wt.% のオレイン酸ナトリウムを添加した後、90℃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 0.1mS/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℃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。

### 3. 2 サイズ分級の方法

3.1 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 8nm 以下の粒子を除去した。

### 3. 3 サイズ分級の結果

Fig. 2 (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。(b) では 8nm 以下の粒子を削除することができた。

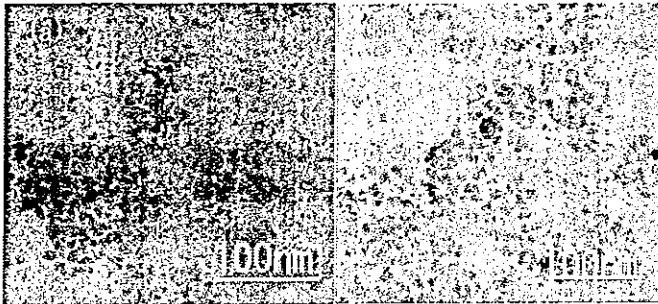


Fig.2 TEM photographs of magnetite particles (a) before and (b) after size classification.

## 4. 交流磁場発生装置を用いた実験

2章にて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なった。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。

### 4. 1 実験装置

装置全体を Fig. 3 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 50mm であり、直径 4mm 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 200W である。

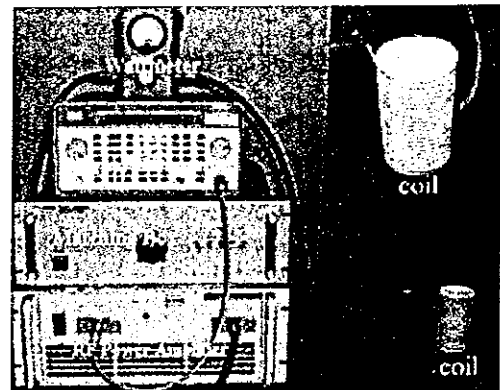


Fig.3 AC-magnetic field generator

### 4. 2 実験概略

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。

### 4. 3 実験結果

Fig. 4 (a) に粒子濃度を変化させた場合、(b) に粒度分布を変化させた場合の温度測定結果を示す。(a) において、粒子濃度が高いときは、3 分間の交流磁場印加にて 50℃前後の発熱が確認できた。また、粒子濃度の低下による発熱量の減少が確認できた。(b) において、サイズ分級を行う前の粒

子は、粒子濃度が低いため発熱がほとんど起こらなかった。一方、サイズ分級を行い 8nm 以下の粒子を除去した磁性流体については、粒子濃度が同じにもかかわらず高い発熱が確認された。サイズ分級前の磁性流体では、8nm 以下の粒子が全体の粒子数に対して約 30%程度、サイズ分級後の磁性流体では、約 3.4%含まれている。

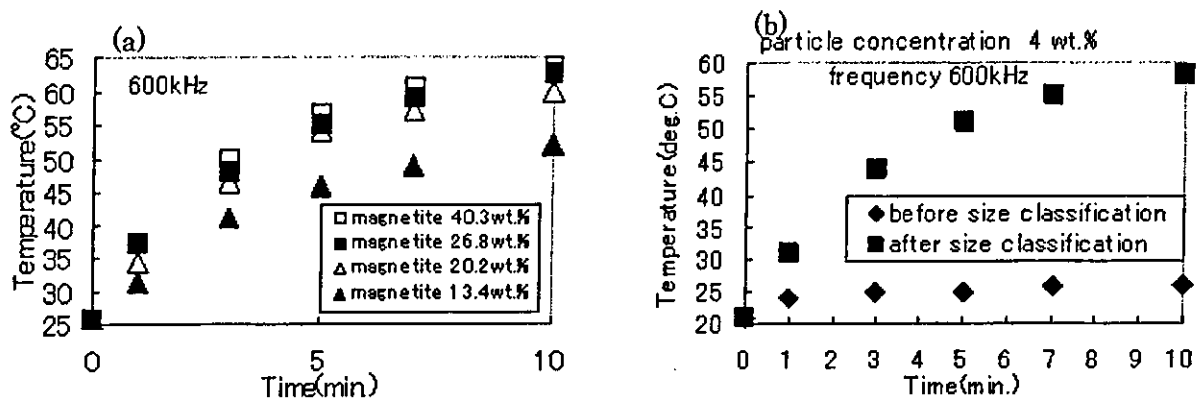


Fig.5 Temperature of magnetic fluids exposed to AC magnetic field as a function of time. (a) magnetite particles concentration, (b) magnetite size distribution

#### 4. 4 実験のまとめ

交流磁場発生装置を用いて、磁性流体の発熱測定を行った。本装置にて磁性流体の発熱を確認することができた。また、サイズ分級を行い 8nm 以下の粒子を除去した磁性流体は、高い発熱が確認された。

#### 5. まとめ

理論式を用いてMFHに適した磁性ナノ粒子の検討を行った。緩和機構、発熱量などの検討を行った結果、11-13nm のマグネタイトを用いた場合の発熱量が最も高くなることがわかった。また、マグネタイト粒子の直径によって発熱量が大きく異なり、直径 8nm 以下の粒子では発熱がほとんど起こらないことがわかった。

理論式の結果を確認するために、マグネタイト粒子のサイズ分級を行い、8nm 以下の粒子を除去した磁性流体を作製した。

さらに交流磁場発生装置の設計を行い、これを用いて磁性流体の発熱を確認した。サイズ分級を行った磁性流体と行わなかった磁性流体の測定結果を比較すると、8nm 以下の粒子は発熱に関与していない可能性が非常に高いことがわかった。

#### 参考文献

1. A.Jordan, R.Scholz et al., Int. J. Hyperthermia, 13 (1997) 83
2. A.Jordan, R.Scholz et al., J. Magn. Magn. Mat., 201 (1999) 413
3. Ch.Alexiou, W.Arnold et al., Cancer Research, 60 (2000) 6641
4. Ch.Alexiou, A.Schmidt et al., J. Magn. Magn. Mat., 252 (2002) 363
5. G.Prioult, C.Turcotte et al., Int. Dairy Journal, 10 (2000) 627
6. Peter R. Levison, Stephen E. Badger et al., J. Chromatography A, 816 (1998) 107
7. R.E. Rosensweig, J. Magn. Magn. Mat. 252 (2002) 370-374
8. O.Perales, H. Sasaki, A. Kasuya, B. Jeyadevan, K. Tohji, T. Hihara, and K. Sumiyama, J. Appl. Phys., 91 (2002) 6958

# スキャホールド用の異なる直径を持つ単層カーボンナノチューブの高純度精製

東北大学大学院 環境科学研究科 環境科学専攻

佐藤義倫、田路和幸

## 1. はじめに

細胞培養における細胞増殖はスキャホールドの素材、形状に大きく依存する。近年、生体親和性の高いと言われているカーボンナノチューブはスキャホールドとして注目を浴びている。これまで、3次元で様々な形状を持たせたナノチューブスキャホールドの研究や、様々な官能基を持たせたナノチューブの細胞増殖の研究が行われている。本研究では、細胞増殖に関するSWCNTsの直径の影響を調べるために、直径の異なるSWCNTsの高純度精製を行った。

## 2. 実験方法

**SWCNTs の合成** SWCNTsはヘリウムガスなどの希ガスをチェンバー内に充填した状態で、金属触媒入りの陽極と陰極に炭素電極を用い、直流電流を流し、2つの電極を5mm程度離れた状態でアーク放電を行う。使用する金属触媒の種類により、チューブの収率および直径などが変化することが知られている。今回は使用した金属触媒はFe/Ni、Co/Ni、Y/Ni、Niをそれぞれ使用した。合成はヘリウム100 Torr、アーク電流値70Aで行った。精製するススは、天板ススと壁ススとした。

**SWCNTs の精製手順** 合成して得られたススは大気中、723 Kで30分間燃焼酸化させた。酸化後、大気中、773 Kで30分間燃焼酸化させ、処理したサンプルを6M-HCLに入れ、333 Kで12時間静置させ金属微粒子を除去した。この溶液をメンブランフィルターで濾過し、大気中、333Kで乾燥させた。次に乾燥したサンプルを大気中、773 Kで30分間燃焼酸化し、6M-HCLに入れ、333 Kで12時間静置させた。最後に溶液を濾過し、濾液が中性になるまで蒸留水で洗浄した後、濾物を大気中、333Kで乾燥させた。精製したSWCNTsの評価は、SEM、TEMにより観察した。

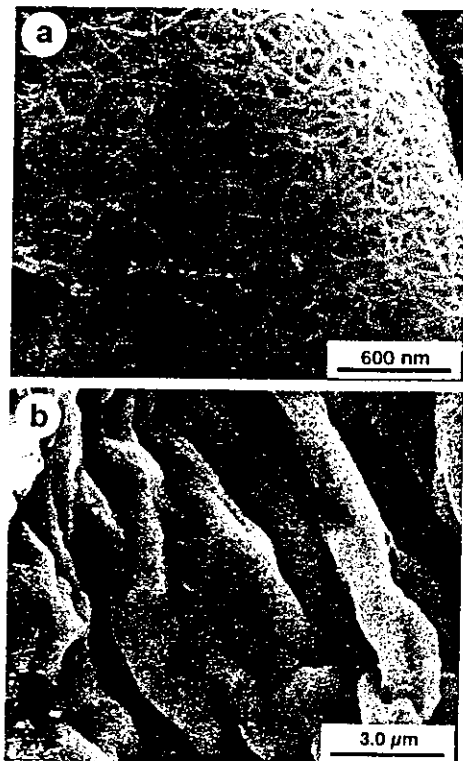


図 Co/Ni触媒で合成したSWCNTsのTEM像。(a) 高倍率。(b) 低倍率。



# 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

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、われわれが樹立した異なる形質を有する2つのミニプタ由来歯根膜細胞株TesPDL-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について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。

## 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\_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プタ（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。これらの細胞についてアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性染色を行った。また各種遺伝子発現についてRT-PCR法を用いて測定した。

### 【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】

これらの細胞を, 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。

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。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ALP活性を, 活性染色法を用いて測定した。

### 3. 結果ならびに考察

ALP活性染色をしたところ, TeSPDL-11細胞は高いALP活性, TeSPDL-12細胞は低いALP活性を示し, これらのクローン化された細胞株間の違いは歯根膜組織のheterogenousな細胞集団を反映しているものと考えられた。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サイズをこれらの細胞に添加し培養し, DNA合成ならびにALP活性を無添加のコントロールと比較したところ, 反応性に違いが見られた。この結果より, カーボンナノ分子の細胞に対する作用には細胞特異性のある可能性が考えられた。

# カーボンナノホーンのドラッグデリバリーシステム分野への応用

(財) 癌研究会癌研究所・JST-SORST

○村上達也・安嶋久美子・宮脇仁・湯田坂雅子・飯島澄男・芝清隆

## 1. 緒言

カーボンナノホーン (NH) は平均径80nmの大きさを持つ、ホーン状単層グラファイトシートの凝集体である。その酸化処理で得られるNHoxは、グラファイトシート表面に平均径1~2nmの細孔とその細孔周囲に酸素含有置換基を有し、物質貯蔵担体として注目を集めている。本研究ではNHoxの薬物送達担体としての可能性を探索するため、薬物-NHox複合体の調製および試験管内レベルでの機能評価を行った。

## 2. 実験

抗炎症薬であるDexamethasone (DEX) をNHoxとEtOH/H<sub>2</sub>O (=50/50) 中で混合し、室温で終夜静置させた。反応液を18000g, 4℃で5分間遠心し、上清を除去し、残渣としてDEX担持NHox (DEX-NHox) を得た。NHoxのDEX吸脱着の速度論的検討には<sup>3</sup>H]-labeled DEXを用いた。生物学的活性の評価にはマウス前骨芽細胞株MC3T3-E1の培養液にDEX-NHoxを添加し、DEX依存性アルカリフォスファターゼ (ALP) 発現誘導を検討した。

## 3. 結果と考察

DEXのNHoxへの吸着は熱重量分析により確認した。<sup>3</sup>H]-labeled DEXを用いて定量的に検討したところ、NHox 1gあたり200mgのDEXが吸着されていた。また、EtOH/H<sub>2</sub>O (50/50) 中では、DEXのNHoxへの吸着は数分以内で飽和に達することも判明した。

次に、NH酸化処理のDEX結合に及ぼす効果を検討するため、DEX結合量をNHoxとNHで比較した。その結果、1.27mM DEX処理時で比較した場合、NHoxはNHに比べて約6倍量のDEXを吸着できることが分かった(図1)。DEXは、NHox細孔周囲の酸素含有置換基と水素結合を形成しうる複数の官能基を有する。一方、NHoxを水素処理すると細孔周囲の酸素含有置換基を大幅に除去できることが知られている。NHoxへの吸着メカニズムを検討するため、水素処理NHox (NHox-H<sub>2</sub>) を作製した。同様の検討を行ったところ、NHox-H<sub>2</sub>はNHに比べて約5倍量のDEXを吸着し(図1)、水素処理のDEX吸着に及ぼす効果は小さいことが明らかとなった。以上の

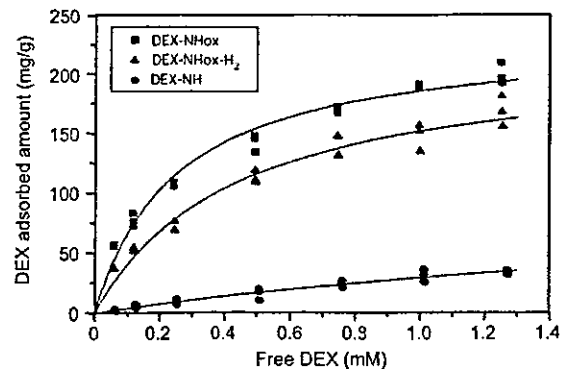


図1 各種NHへのDEX吸着の定量的解析

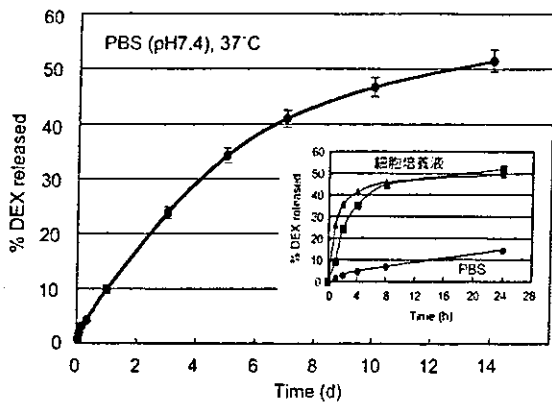


図2 中性水溶液中におけるDEX-NHoxのDEX放出特性

結果から、NHoxの優れたDEX吸着特性は、NHox細孔周囲の酸素含有置換基とDEXの水素結合よりもむしろ、ホーン内部空間へのDEX内包によってもたらされていることが示唆された。

薬物のcontrolled release (徐放)は、ドラッグキャリアに求められる重要な性質の一つである。DEX-NHoxを0.005wt%で等張リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)に懸濁し、37℃で静置した。一定時間後に放出されたDEXを定量したところ、1日後で担持したDEXの10%、14日後で52%が放出されることが分かった(図2)。この結果から、DEX-NHoxはPBS中でDEXを徐放できることが明らかとなった。また、種々の有機化合物が含まれる細胞培養液中では、放出が促進されることも分かった(図2 inset)。いずれの溶液中においてもDEX放出は2相性を示し、DEXは複数の吸着様式でNHoxに内包されていることが示唆された。

DEX-NHoxがDEX生物活性を保持しているかどうかを検討するために、DEX応答性のほ乳動物細胞を用いて評価を行った。DEXは骨形成過程における前骨芽細胞の成熟骨芽細胞への分化を促進する。アルカリフォスファターゼ(ALP)の細胞内発現量は、この分化の指標として用いられる。DEX-NHoxでマウス前骨芽細胞株MC3T3-E1を処理すると、細胞内ALP発現が誘導され、DEX-NHoxから放出されたDEXはその活性を保持していることが明らかとなった(図3)。

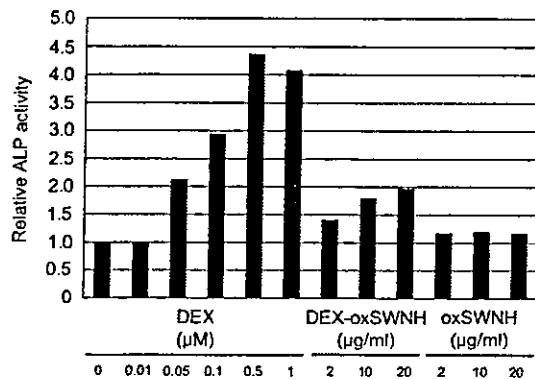


図3 ほ乳動物細胞を用いたDEX-NHoxの生物活性評価

以上の結果から、NHoxは新しい薬物送達担体として機能し得る可能性が示された。現在、実験動物レベルでの薬効評価を目指して、NHoxへの水溶性賦与を検討中である。

Murakami, T.; Ajima, K.; Miyawaki, J.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Shiba, K. Drug-loaded carbon nanohorns: adsorption and release of dexamethasone in vitro. *Mol. Pharm.* 2004, 1, 399-405.