

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

○木村邦衛¹⁾、渋谷真希子¹⁾、平沖敏文²⁾、野田坂佳伸¹⁾、古月文志³⁾、宇尾基弘¹⁾、
赤坂 司¹⁾、佐藤義倫⁴⁾、田路和幸⁴⁾、福島和昭¹⁾、亙理文夫¹⁾、鈴木邦明¹⁾

1) 北大院・歯、2) 北大院・工、3) 北大院・理、4) 東北大院・工

1. 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ンラベルした、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。

2. 材料および方法

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、スピンラベル剤には 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 (τ) 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。

3. 結果および考察

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 μm に分布し、20 から 40 μm 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 μm 程度であった (Figs. 2-5)。

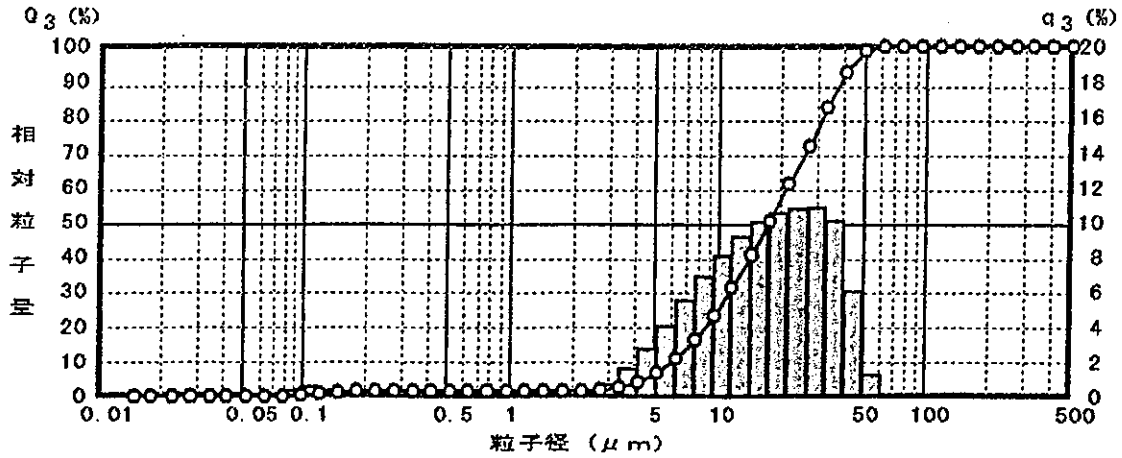


Fig. 1 粒度分布測定 (MLV)

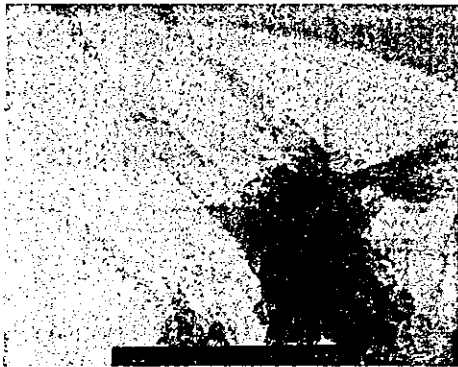


Fig. 2 acid_cut_NL2_MW_031003



Fig. 3 ET_ozon_cut_NL2_MW_031003



Fig. 4 acid_cut_CNF_031003

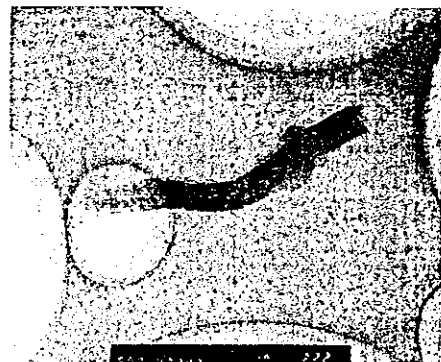


Fig. 5 acid_cut_CNF_031003

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 α においても非添加のものとはほぼほとんど差がなく (Table 1)、この条件下では 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。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。

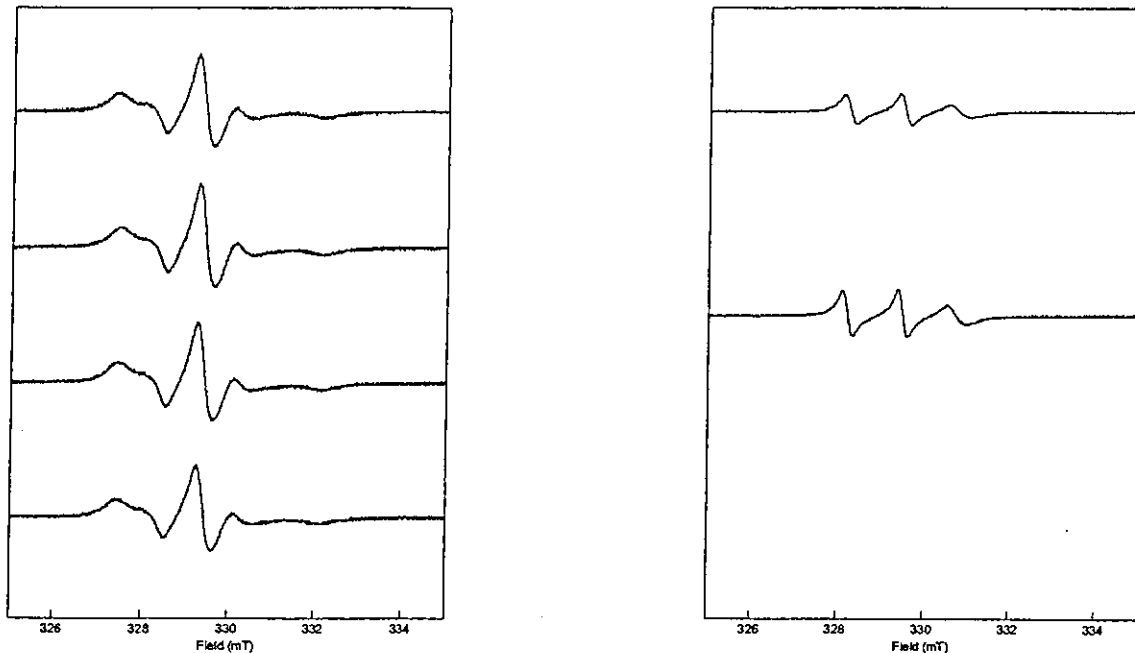


Fig. 6 EYPC(MLV)に組み込まれた 5-DSA の ESR スペクトル(上から control, acid cut NL2, ET ozone cut NL2, acid cut CNF) (左)

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)

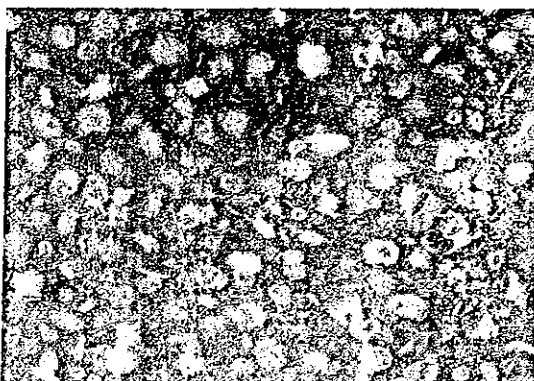


Fig. 8 多重層リポソーム (MLV)

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 μm に分布し、1.5から15 μm 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 τ 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) ことから、この条件でも添加したCNTはリポソーム膜の流動性には影響を与えないと推定された。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リ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。

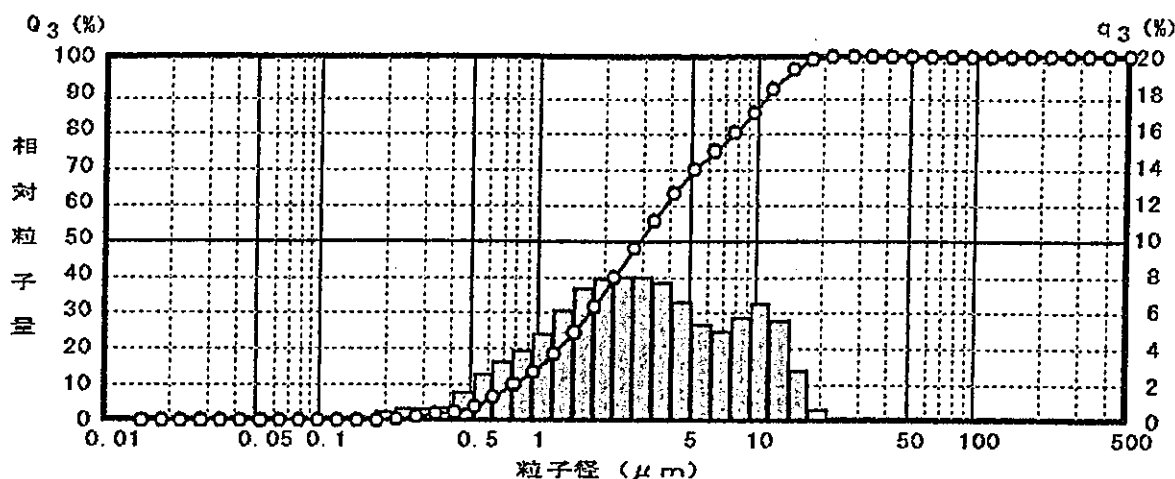


Fig. 9 粒度分布測定 (LUV) (上)

Fig. 11 大きな1枚膜リポソーム (LUV) (右下)

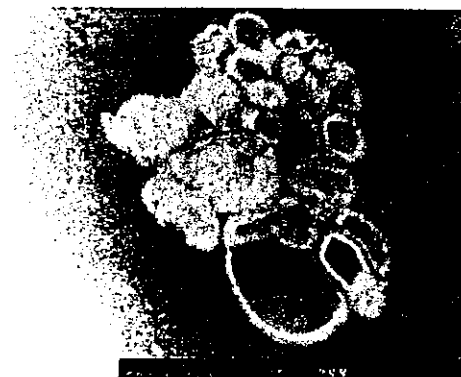
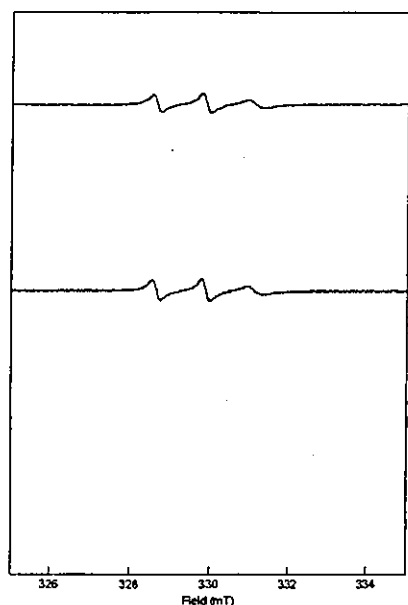


Fig. 10 EYPC(LUV)に組み込まれた16-DSAのESRスペクトル(上から acid cut NL2, ET ozon cut NL2) (左上)

Sample	S	τ (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+acidcut CNF0.1mg/ml	0.16	38
16-DSA+MLV+acidcut CNF0.2mg/ml	0.14	41
16-DSA+MLV+acidcut CNF0.2mg/ml 1回目 (相分離前)	0.13	40
16-DSA+MLV+acidcut CNF0.2mg/ml 2回目 (相分離後)	0.14	42
16-DSA+MLV+acidcut CNF0.2mg/ml 3回目 (相分離後)	0.12	41
16-DSA+LUV+acidcut NL2 0.1 μ g/ml	0.12	36
16-DSA+LUV+ET ozon cut NL2 0.1 μ g/ml	0.11	37

Table. 1 測定した ESR スペクトルの S および τ

4) リポソームを用いた ESR 測定中に、CNT あるいは 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。ESR 測定のためのマイクロ波の電場成分が電導体である CNT あるいは CNF に影響を与えた結果の可能性があると推定しているが、さらに検討を加えたい。

4. まとめ

研究を開始したばかりでまだ preliminary な結果であるが、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らかなリポソームを作成してその効果を調べるのが必須であり、今後、種々条件を変えたり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。

細胞も含めたナノ材料の3次元電子顕微鏡観察の現状

名古屋大学エコトピア科学研究機構 田中信夫

ナノ材料はバルク結晶と異なり長範囲にわたる周期構造 (=1次構造) をもたない。その上のレベルの2次構造がその特性を決める重要な鍵をにぎっている。この事情はタンパク質の1次構造と高次構造との関係に対比できるかもしれない。この2次構造を形態または組織 (texture) と言いかえると、電子顕微鏡はその研究にとって極めて有用な装置である。

1次構造の解明に強力な X 線回折法は長周期性が必要なので、2次構造の研究領域では実空間法である電子顕微鏡法が有力になる。近年の電子顕微鏡法では、ナノ材料試料の3次元形態の可視化が可能になった。本講演では著者らのデータを使ってこの3次元電子顕微鏡法の現状を紹介する¹⁾。

軽元素からなる非晶質試料が大部分である生物試料では3次元観察法—電子線トモグラフィー法—は1970年代から研究されている。それは試料の電子線方向への投影ポテンシャルが概ね像強度に比例するからである。この条件のもとでコンピュータトモグラフィー (CT) で使われる逆投影法などのルーチンが3次元像の再構成のために使用できる。しかし結晶性のナノ材料への適用は1990年代からはじまったものである。その理由は結晶回折効果や動力学回折効果により上記の近似がそのまま適用できないからである。1997年に我が国でも暗視野STEMをベースにしたナノ材料観察のための3次元電子顕微鏡開発の国家プロジェクトがスタートし、講演者もそれに参画した。これは世界的にみても早い研究プロジェクトであった。このプロジェクトの中では3次元観察用の300kVの専用装置が開発され²⁾、酸化物微粒子^{1,3)}、ナノチューブ⁴⁾、白金触媒^{1,4)}、半導体回路^{1,5)}などが観察された。2000年来、このトモグラフィー法は通常の明視野法のものも製品化され、ソフトウェアも充実して現在にいたっている。我々の研究室ではこのTEMトモグラフィー法の基礎から応用までを幅広く研究している。ハードディスク材料のFePtクラスター⁶⁾、半導体量子ドット構造、光触媒、高分子⁶⁾およびヒトの細胞⁷⁾など多くの研究成果がでていいる。ここではその一端を紹介する。

本講演の前半は、科学技術振興調整費「3次元電子顕微鏡の開発」の援助をうけて得られたデータである。関係の岩木氏 (理研)、柿林氏 (日立) らに感謝します。

- 1) 田中信夫：顕微鏡、39 (2004) 26.
- 2) M. Koguchi et al. : J. Electron Microscopy, 50 (2001) 235.
- 3) N. Tanaka et al. : Proc. EMAG (2001), pp159
- 4) J. Yamasaki et al. : Philo. Mag. 84 (2004) 2814.
- 5) N. Tanaka et al. : Proc. 8APEM (2003) (#42009)
- 6) 高野ら：高分子討論会予稿集(2004)
- 7) 牧原、白倉：第61回電子顕微鏡学会(筑波)、発表予定(2005)

焼結したカーボンナノチューブ固化体の生体適合性

王蔚、横山敦郎、川崎貴生、廖素三、宇尾基弘¹、赤坂司¹、
亘理文夫¹、大森守²
北大院・歯・有床義歯補綴、¹北大院・歯・歯科理工
²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

目的

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)およびポリ乳酸(PLA)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30wt%になるようにPCSを炭化水素溶媒n-ヘキサンに溶解後、また、30wt%PLA粉末をCN2CL2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の混合粉末およびMWCNTsとPLA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、PCSでは焼結圧力120MPa、焼結温度1000℃で焼結を行った。PLAでは温度160℃、40MPaで焼結した。

2 固化体の分析

焼結体はラーマン分光装置(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。

3 生体適合性試験

MT3C3-E1細胞を用い、焼結圧120MPaで、PCS含有量30wt%で焼結した試料と焼結圧160MPaで、PLA含有量30wt%で焼結した試料を細胞培養しました。

結果および考察

ラーマンスペクトルは、焼結条件によらず、1312cm⁻¹と1555cm⁻¹付近にMWNTのピークが検出され、2878cm⁻¹

付近にSiCのピークが検出された。

X線回折について、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は固化体断面の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。SEM像により、CNTsの表面で粒状物があることが観察された。この粒状物はSiCであるという可能性がある。図2は固化体の透過電子顕微鏡(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。CNTsのチューブ内の竹節状構造が認められた。TEM観察によりCNTsの周囲にSiCと考えられる粒状物が観察された。

細胞培養の結果について、コンクローラにおいて固化体の細胞数と蛋白量は顕著な区別が観察されなかった。

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とポリ乳酸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。固化した試料は、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/PCS 焼結体の断面のSEM像

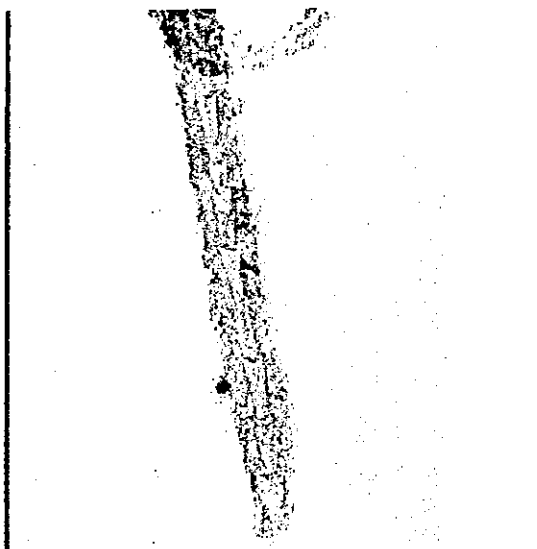


図2 MWCNT/PCS 焼結体のTEM像

カーボンナノチューブ膜の試作、ナノカプセルの精製時の変性及び生体内微粒子のXAFS分析

○宇尾基弘¹・赤坂 司¹・Rosca Iosif Daniel¹・亘理文夫¹

朝倉清高²・横山敦郎³・田村一央⁴・戸塚靖則⁴

(北大院 歯学研究科¹ 歯科理工² 触媒化学セ³ 補綴一⁴ 口外二)

佐藤義倫・田路和幸 (東北大院 工学研究科)

1. 目的

カーボンナノチューブは化学的に安定であることから、その膜状固化体が得られれば、触媒担体や細胞培養用担体など種々の用途が考えられる。そこで多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の膜の作製を試みた。また金属炭化物含有カーボンナノカプセル (MECNC) 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。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適している。今回はナノカプセル精製時、特に大気酸化時の変化を検討した。



図1 CNCのTEM像

また前回に引き続き、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 XAFS により分析し、インプラントから生体組織へのチタン微粒子の移行について検討した。

2. 方法

【ナノチューブ膜の作製】

カーボンナノチューブ (Nanolab 社製) を空気酸化、酸処理後、1wt% Triton X100 溶液 50ml に 40mg 添加し、メカニカルホモジナイザー (9000rpm) で 1 ~ 5 分間 攪拌した。この分散液をフィルター径 : 25mm, 孔径 : 0.8 μ m のポリカーボネートフィルターで濾過・乾燥してナノチューブ膜を得た。これを SEM により微細構造を観察した。

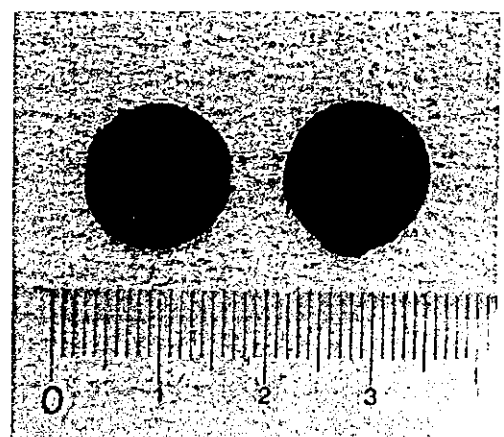


図2 ナノチューブ膜の外観

【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 (以下 Ce-CNC 等と記す) を大気中で 400 $^{\circ}$ C, 450 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C \times 5 時間、超音波処理したものについても

同様に調査した。

【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。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。

3. 結果及び考察

【ナノチューブ膜の作製】

得られたナノチューブ膜の SEM 像を以下に示す。

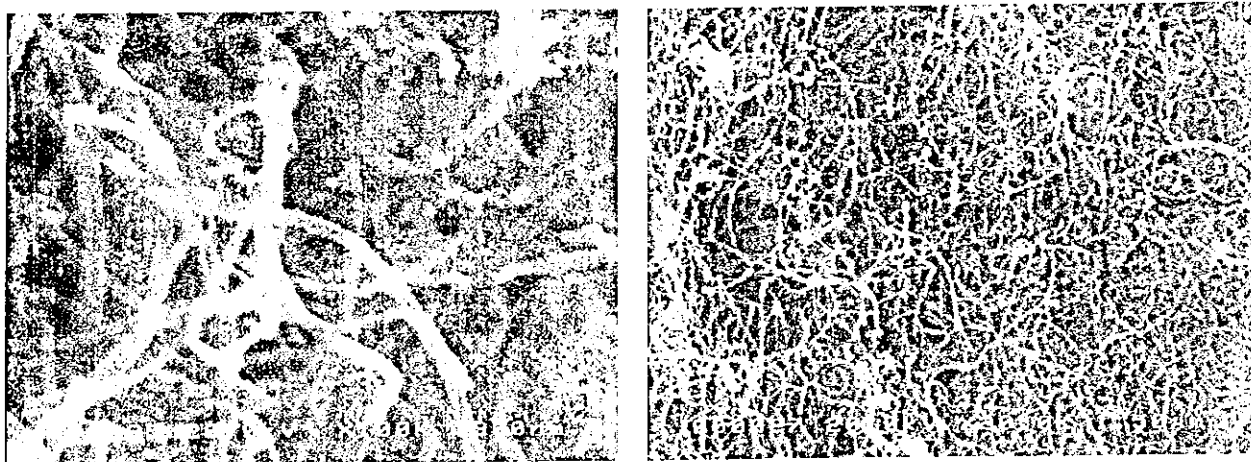


図 3 ホモジナイザーで 1 分間攪拌後に濾過し、製膜した試料の断面 SEM 像



図 4 ホモジナイザーで 5 分間攪拌後に濾過し、製膜した試料の断面 SEM 像

SEM 像より、特に攪拌時間によらず MWCNT が絡み合った構造が見られる。界面活性剤による分散とメカニカルホモジナイザーによる攪拌の効果により、均質な MWCNT 分散液が得られ、MWCNT 膜の均質性に寄与したと考えられる。但し、この膜は極めて脆く、SPS 焼結等 CNT 相互の結合を強化する方法を模索する必要がある。

【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 °C で大気酸化した場合の希土類炭化物の変化を図 5 に示す。

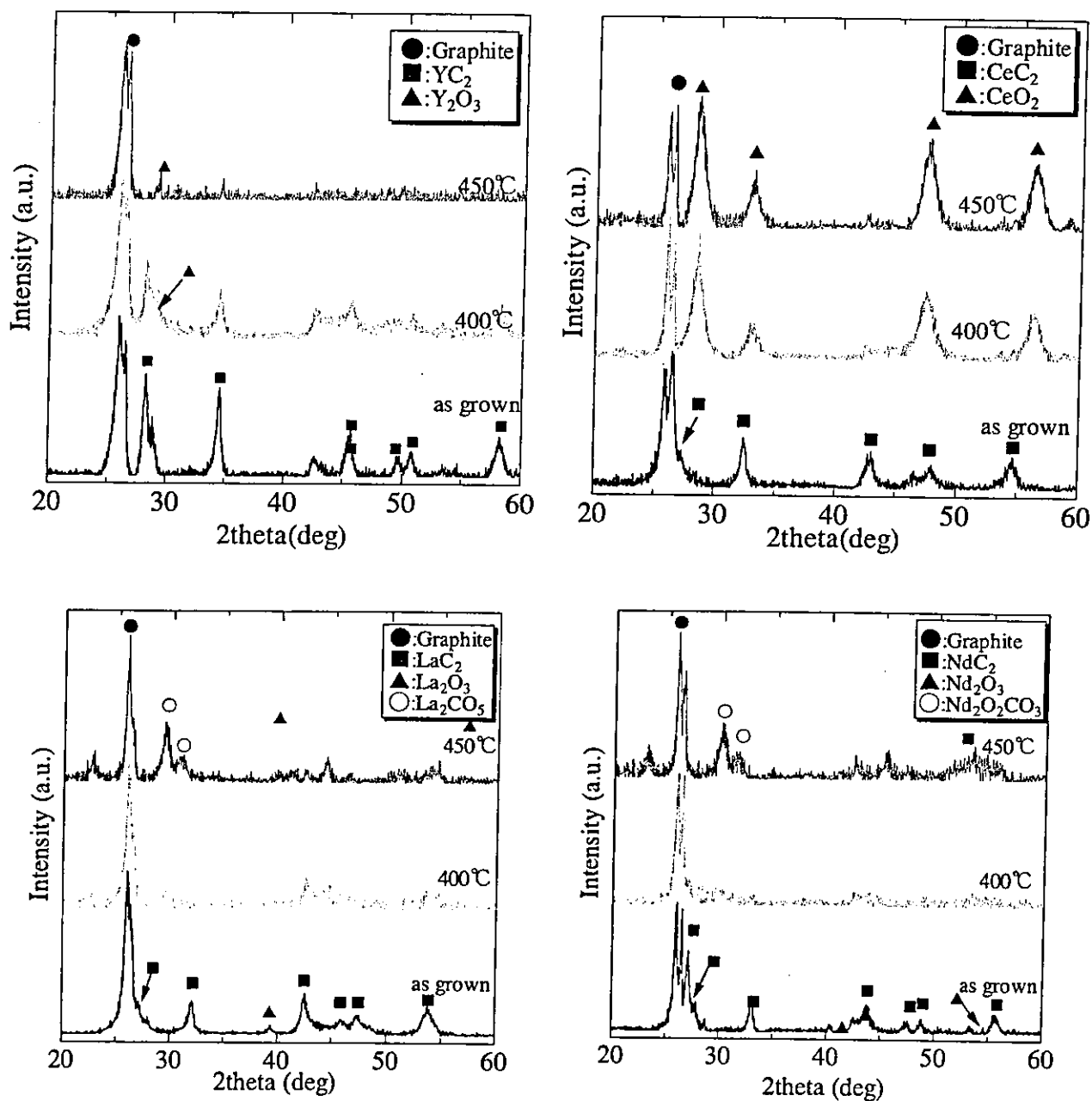


図 5 大気酸化した Y, Ce, La, Nd 含有 CNC の XRD 結果

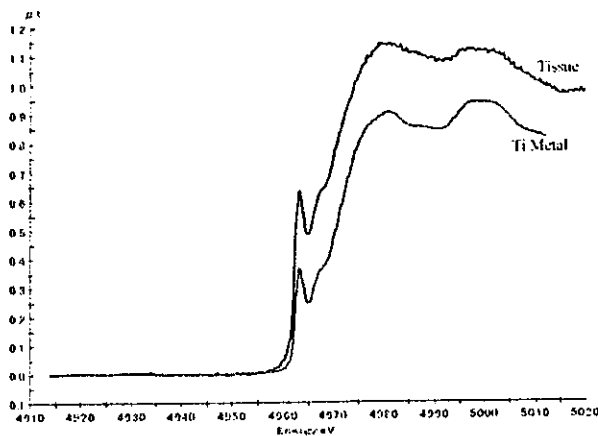
いずれの CNC においても 400 °C という比較的低温から酸化が起こることが分かる。大気酸化によ

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 °C 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。

【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。

前回の測定時には金属微粒子状 Ti と TiO₂(anatase)と推定される Ti が検出されたが、さらに数例の分析を行った所、金属微粒子状 Ti が多く検出されたが、Ti と anatase の重ね合わせと推定される事例も



僅かに見られた。

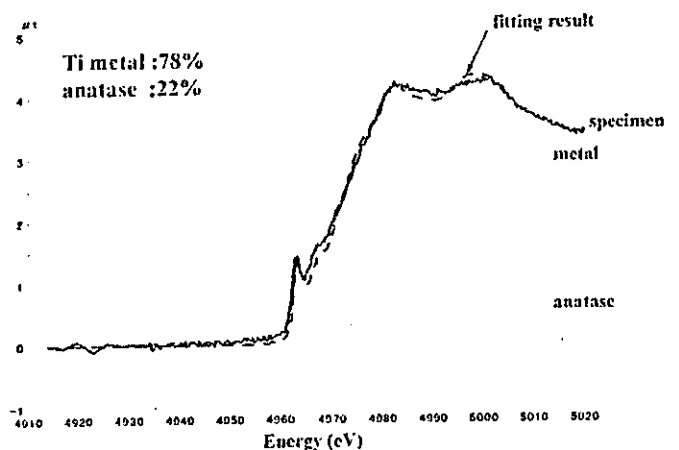


図 6 Tiインプラント周囲組織の XANES スペクトル (左：金属 Ti, 右：金属 + anatase)

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物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る。当該試料で使用しているインプラント表面は機械加工されたままの表面であり、特に酸化処理などを施されていないことから、インプラント表面から大量の酸化物皮膜が脱落するとは考えに

くい。また生体内という比較的穏和な条件下で、XSAM の元素分布像で明らかな局在としてとらえられるほどの Ti が溶出することもまた困難と考えられ、その生成メカニズムについては更に検討を要する。

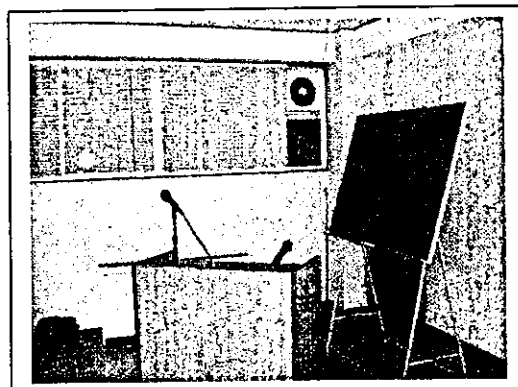
【参考文献】

1)Asakura K., Inukai J., Iwasawa Y., Structure of One-Atomic-Layer Titanium Oxide on Silicon Oxide and Its Palladium-Mediated Restructuring, *J. Phys. Chem.* 96, 829-834, 1992

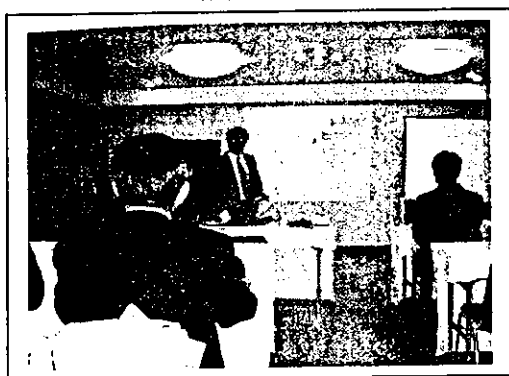
ナノチューブ、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の組織反応性とバイオ応用
(課題番号：H14-ナノ-021) 平成16年度冬季第6回研究成果発表会



報告会会場



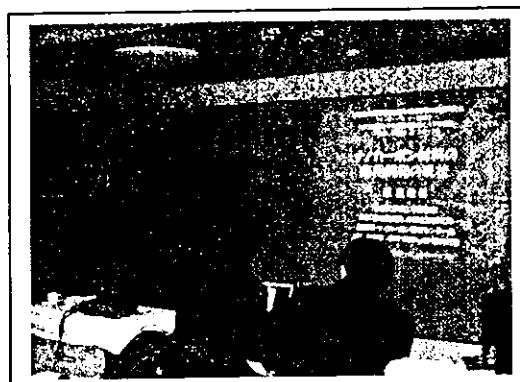
借用マイク など



主任研究者 亘理文夫先生

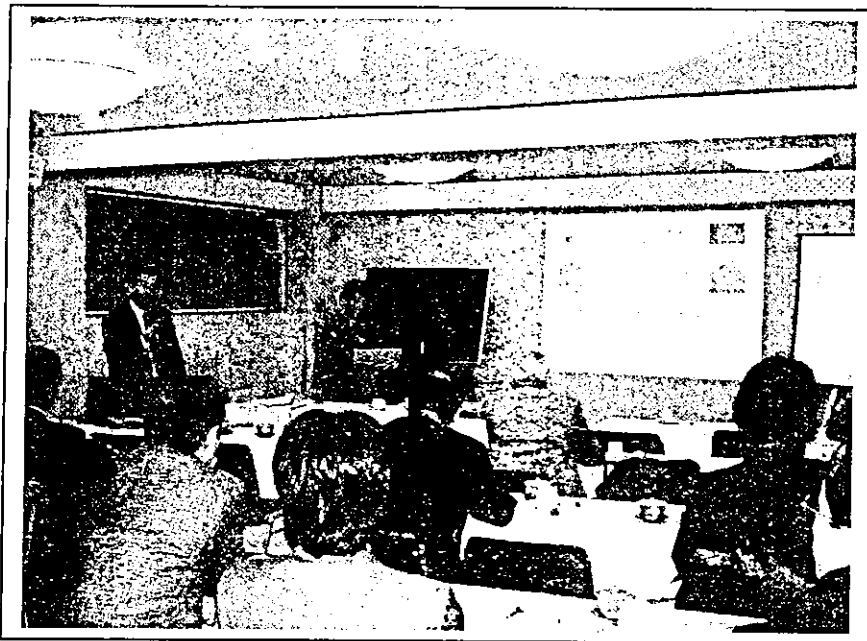


名城大学工学部 飯島澄男先生





平成 17 年 2 月 14 日 出席者



Dr. Antonietta M.GATTI, Univeristy of Modena and Reggio Emilia, Italy

