

図6 人工体液中で CNT 表面に析出したアパタイト微結晶の SEM 像

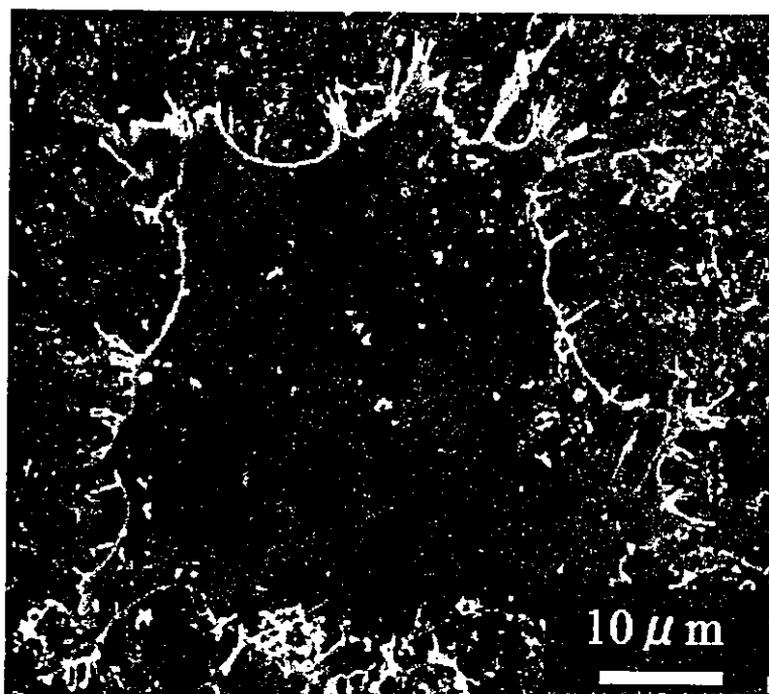


図7 CNT スカフォールド上で成長、展伸した細胞の SEM 像

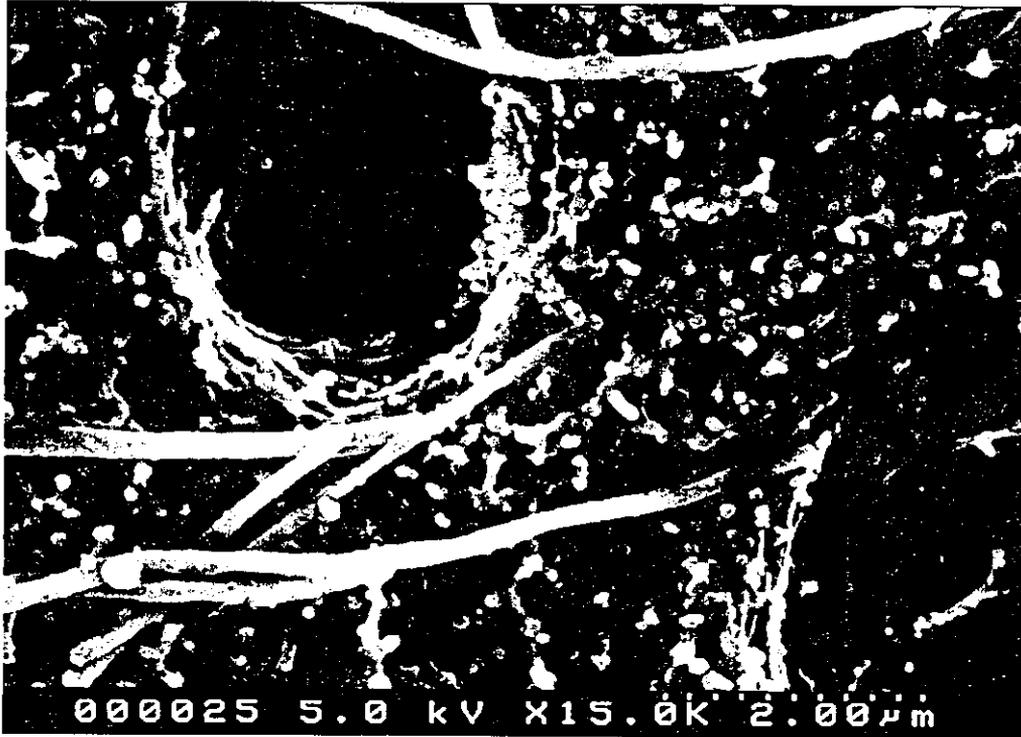


図8 象牙質とCNT。多数のコラーゲンと象牙細管が見える。

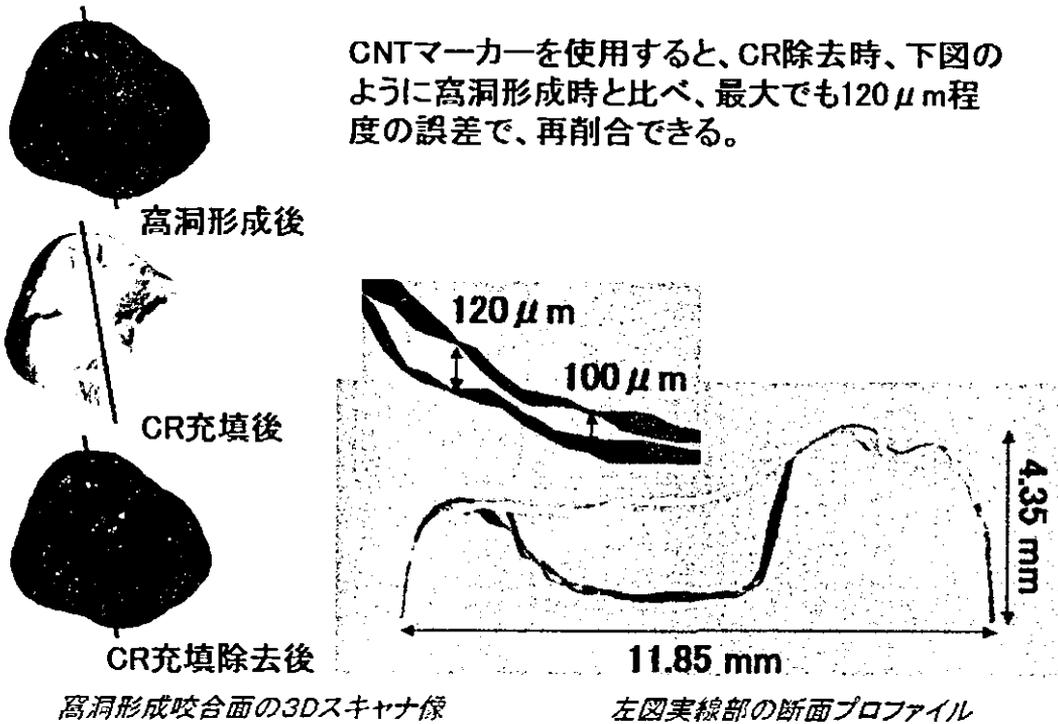


図9 CNT マーカーを塗布した場合のコンポジットレジン修復後、再削合時の断面プロフィール。CNT のマーカー効果により、不要な歯質削合はほとんどない。

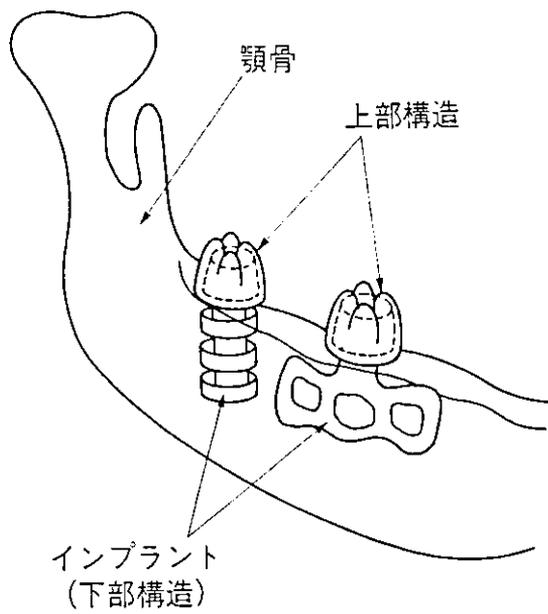


図10 デンタルインプラント（人工歯根）
の概念模式図



図11 Ti表面に形成された窒化チタン層の
断面SEM像

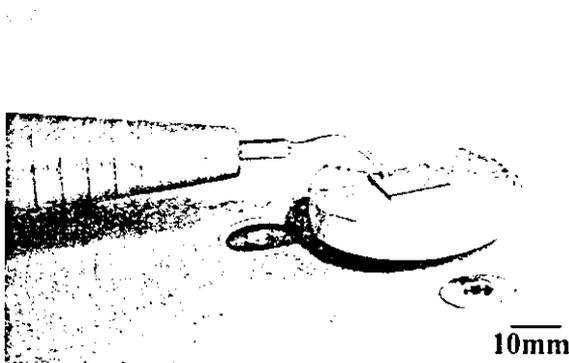


図12 歯科用超音波スケーラー摩耗試験

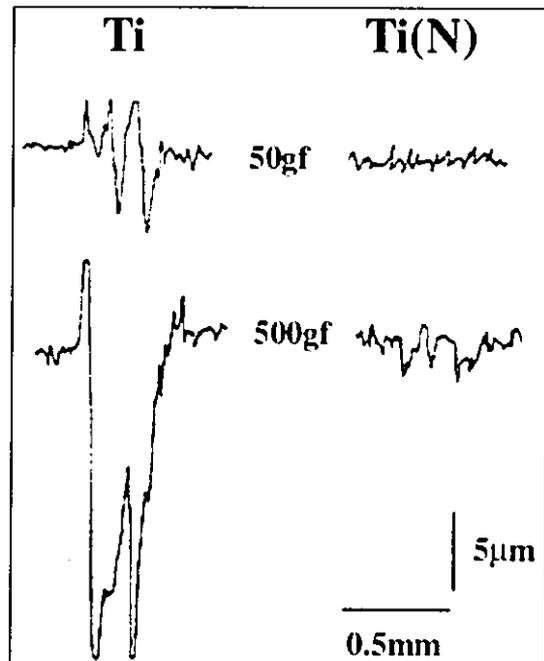


図13 超音波スケーラー摩耗試験後の断面
プロファイル。Ti に比べ、表面窒化チタン
Ti(N)は耐摩耗性がきわめてすぐれている。



図 14 Ti/HAP および TiN/HAP 傾斜機能型インプラント。左から右端へ 10% ずつ 11 段階で HAP 含有量が増加している。

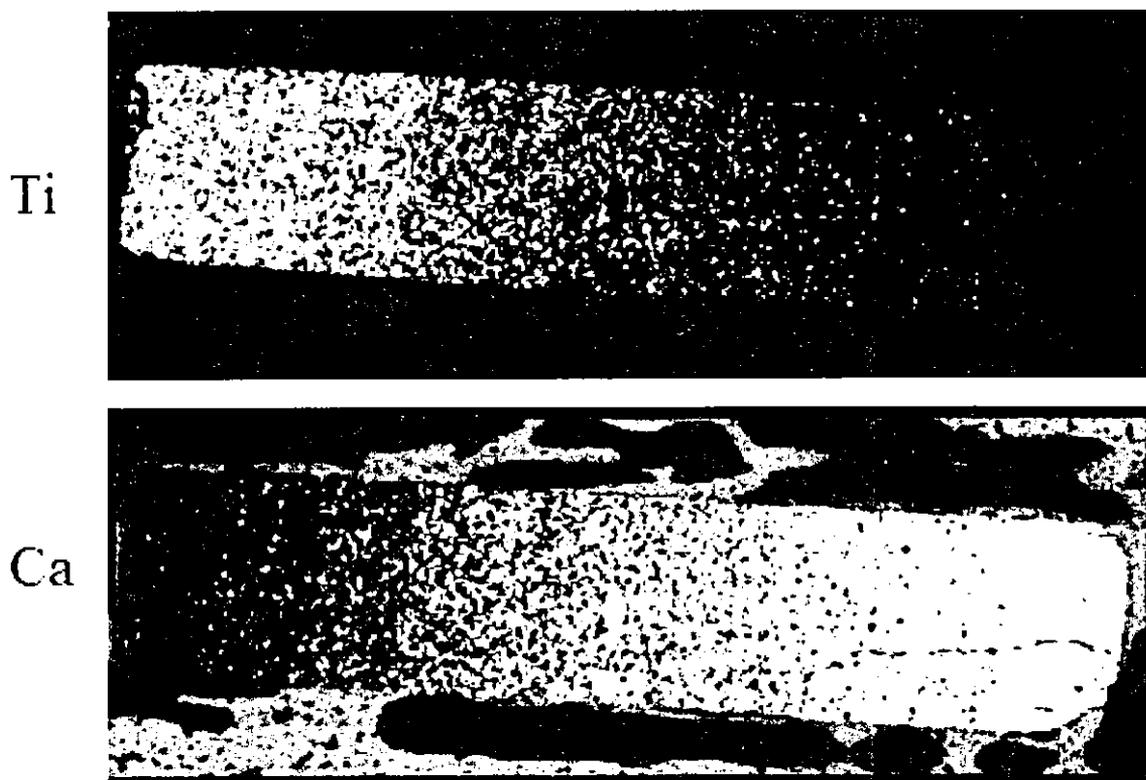


図 15 ラット大腿骨骨髓腔に 8 週埋入後の TiN/HAP 傾斜機能型インプラント周囲組織の EPMA 元素マッピング像 (Ti 像、Ca 像)。インプラント内部の Ti, Ca の濃度傾斜とインプラント周囲の新生骨形成 (Ca 像) が認識できる。

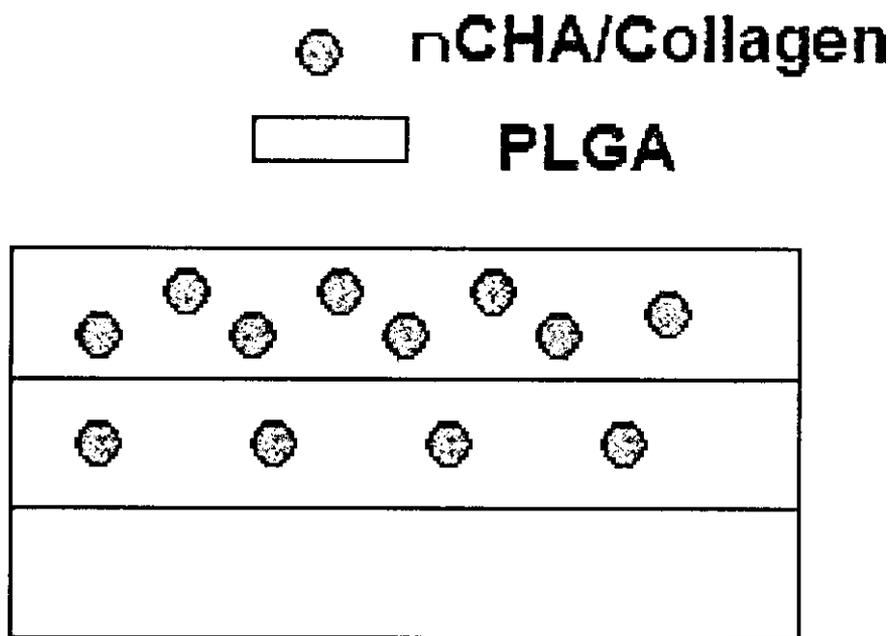


図 16 傾斜機能型 GTR メンブレン膜の概念。nCHAC/PLGA(上面)から PLGA(下面)へ組成が傾斜的に変化する。

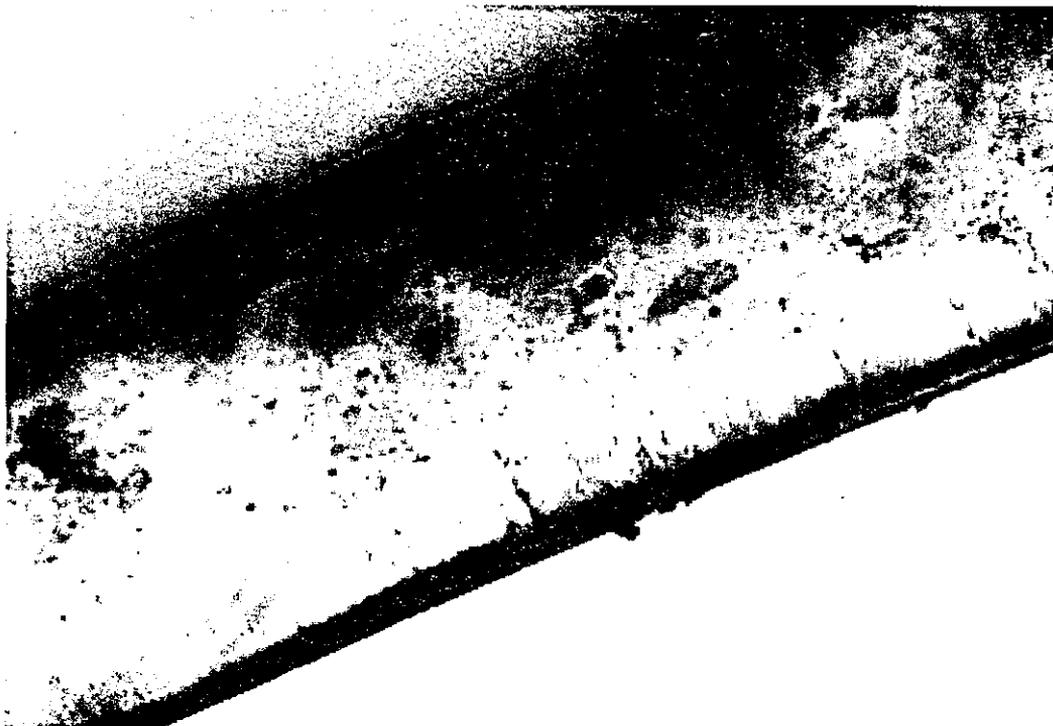


図 17 3層構造の傾斜機能型 GTR メンブレン膜の断面像。上面：nCHAC/PLGA、下面：PLGA。

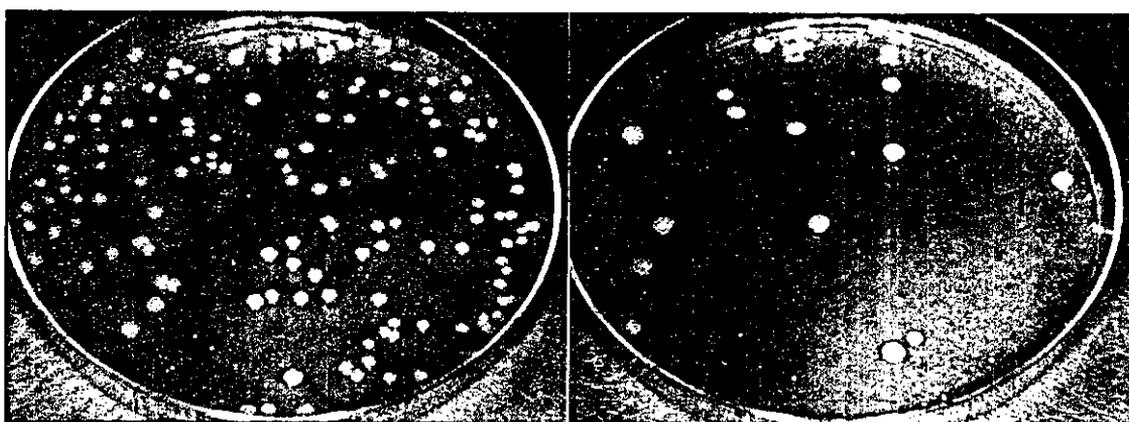


図 18 *Streptococcus mutans* に対する Cu イオン修飾二酸化チタン(TiO_2/Cu)の抗菌効果。
左: TiO_2 、右: TiO_2/Cu 。

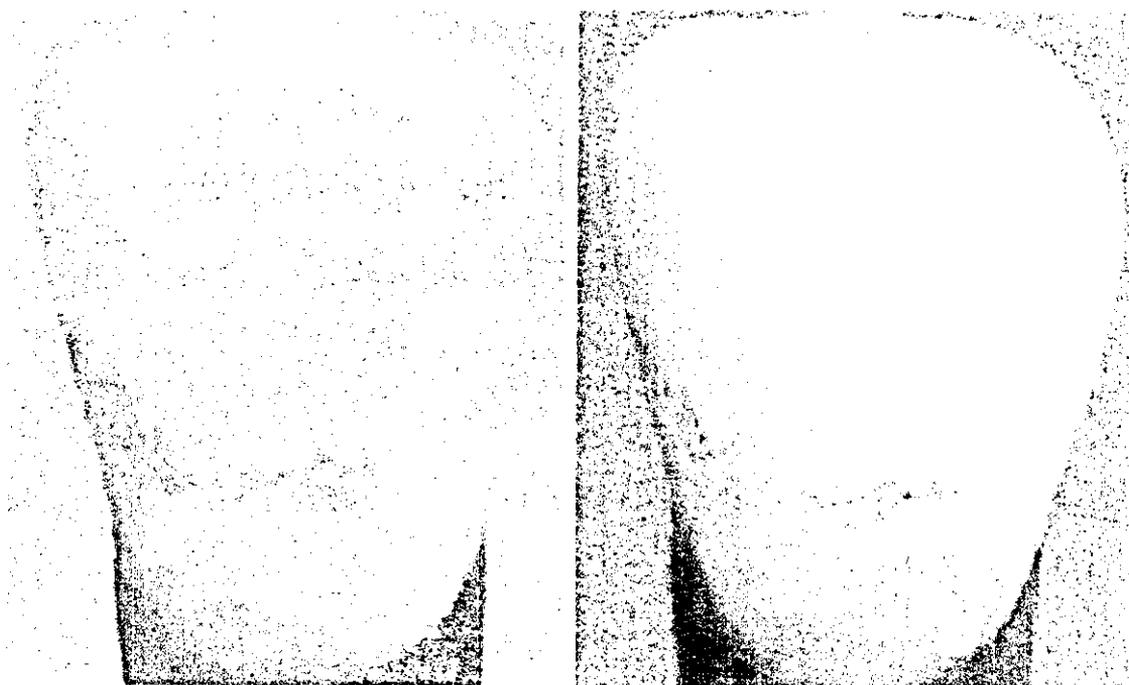


図 19 可視光応答型 Ag イオン修飾二酸化チタン光触媒によるヒト天然歯の
歯牙漂白効果。左: 漂白前、右: 漂白後。

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)
総合研究報告書

カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用

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 赤坂 司 北海道大学歯学研究科 助手
研究協力者 宇尾基弘 北海道大学歯学研究科 助教授

研究要旨 カーボンナノチューブ (CNT) は近年最も注目されている材料の1つであり、バイオ分野での応用研究も開始されつつある。本研究ではバイオ研究を行うための CNT のろ過膜等への固定化や生体親和性やレセプター選択的接着能を付与するため CNT のアパタイトまたはカーボンナノファイバー (CNF) の糖鎖またはタンパク質による表面修飾を検討した。

多層カーボンナノチューブ (MWNT) を分散溶液とし、各種ろ過膜へ吸引ろ過することにより容易に膜上へ固定化が達成された。

また、生体親和性を付与するため MWNT をカルシウムおよびリン酸イオンを含む数種の緩衝液へ浸漬したところ、適度な過飽和度を持つ緩衝液を用いた場合には MWNT を核とした結晶物の析出が観察された。また、PBS (+) にて基質の影響を検討したところ、炭素系では直径 30nm の MWNT 上にて析出量が一番多いことが明らかとなった。

続いて MWNT と同様に CNF でも糖質高分子やタンパク質の吸着による表面修飾が可能か検討を行った。その結果、人工糖質高分子、アルブミン、コラーゲンはいずれも容易に吸着し、表面修飾が達成された。

以上の結果より、析出および吸着による CNT または CNF の表面修飾は、操作が簡便な上に適用できるカーボン基質の適用範囲が広いためバイオ応用研究において様々な場面で有用であると考えられる。

1. カーボンナノチューブの固定化

A. 研究目的

カーボンナノチューブ (CNT) は炭素原子の 6 員環ネットが円筒状に閉じた直径がナノメートルスケールの中空チューブであり、近年最も注目されている材料の1つである。その特異な形状や電氣的性質などから現在ではエレクトロニクス分野やエネルギー分野を中心とした

応用研究が集中的に行われている。CNT のバイオ応用を考えた場合、目的に応じて一本一本の独立したチューブとしての利用、または凝集体としての利用等、様々な形態における応用の可能性が考えられる。

まず、CNT の細胞培養担体としての可能性を検討するため、細胞培養実験に使用可能な形態であるろ過膜上への多層カーボンナノチューブ

ブ (MWNT) の固定化を試みた。

次に、CNT のバイオ分野でのさらなる展開を目指し、生体親和性を付与するため CNT 表面上でのアパタイトの析出を検討した。

続いて、レセプター選択的接着性を付与するためカーボンナノファイバー (CNF) の糖鎖またはタンパク質による表面修飾を検討した。

B. 研究方法

— ろか膜上への固定化 —

200 μ g の MWNT (NanoLab) を 100mL の脱イオン水へ加え、15 分間超音波処理し MWNT を分散させた。超音波処理後の MWNT 分散液は再凝集を防ぐため、すぐに吸引濾過操作を行った。吸引濾過には、PTFE 膜 (Polytetrafluoroethylene、孔径 1.0 μ m、直径 47mm、アドバンテック) および PC 膜 (Polycarbonate、孔径 0.8 μ m、直径 47mm、アドバンテック) を使用し、濾過前には脱イオン水にて十分湿らせた。吸引濾過後の MWNT 固定膜は、膜の収縮を防ぎながら乾燥させるため、吸引濾過器に保持したまま 60 $^{\circ}$ C にて乾燥させた。また、MWNT のみの膜作製のためには 100mg の MWNT を用い、上記と同様な操作を行い、最後にろ過膜上より MWNT 膜を剥がした

— MWNT 上でのアパタイトの析出 —

Ca-P 溶液の組成

・Revised Simulated Body Fluid

NaCl (14.4 mM), KCl (2.0 mM), CaCl₂ (1.13 mM), MgCl₂ (0.29 mM), K₂HPO₄ (1.0 mM), KH₂PO₄ (1.0 mM) and/or NaF (1.2 mM). The pH was adjusted to 7.2 using KOH.

・Standard Simulated Body Fluid

NaCl (7.996 g/L), KCl (224 mg/L), CaCl₂ (278 mg/L), MgCl₂ 6H₂O (305 mg/L), K₂HPO₄ 3H₂O

(228 mg/L), NaHCO₃ (350 mg/L), Na₂SO₄ (71 mg/L), (CH₂OH)₃CNH₂ (6.057 g/L), 1M-HCl (40 mL) and/or NaF (1.2 mM). The pH was adjusted to 7.4 using KOH.

・Salivert (Artificial saliva)

NaCl (844 mg/L), KCl (1.2 g/L), CaCl₂ (146 mg/L), MgCl₂ (52 mg/L), K₂HPO₄ (342 mg/L), others and/or NaF (1.2 mM). The pH is 5.0 ~ 6.0.

・Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

NaCl (8 g/L), KCl (400 mg/L), CaCl₂ (140 mg/L), MgCl₂ 6H₂O (100 mg/L), MgSO₄ 7H₂O (100 mg/L), KH₂PO₄ (60 mg/L), NaHCO₃ (350 mg/L), Na₂HPO₄ (48 mg/L), D-Glucose (1 g/L) and/or NaF (1.2 mM).

・Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)

NaCl (8 g/L), KCl (200 mg/L), CaCl₂ (100 mg/L), MgCl₂ (47 mg/L), KH₂PO₄ (200 mg/L), Na₂HPO₄ (1.15 g/L) and/or NaF (1.2 mM). The pH was adjusted to 7.4 using KOH.

実験操作

新鮮な擬似体液 (100mL) へ MWNTs (NanoLab) または MWNTs (MTR) を 1 mg 加え、15 分間超音波処理し、出来る限り MWNTs を分散させた。その後、37 $^{\circ}$ C にて任意時間静置し、遠心分離 (4000 rpm、10 分) または吸引ろ過にて MWNTs を分離後、脱イオン水にて洗浄した。分離した MWNTs 試料はカーボンコーティングを行い、走査型電子顕微鏡 (SEM、HITACHI S4000) にて表面観察を行った。経時変化および基材の影響を検討するためには擬似体液として Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS) を選択し、同上の操作にて任意時間静置した。

－ 糖質による表面修飾 －

材料

PVLA : Poly-(N-p-vinyl benzyl-0-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-D-gluconamide) (MW : 5×10^4 、生化学工業)、FITC-PVLA : FITC-labeled PVLA (生化学工業)、Albumin from bovine serum (BSA) fluorescein conjugate (Molecular Probes, Inc.)、BSA Gold conjugate (20nmGold, British BioCell International)、FITC 標識 I 型 Collagen (牛皮 (真皮)、Yagai Corp.)

実験操作

－ 糖質による表面修飾 －

糖質化合物による MWNT の修飾

MWNT (NanoLab または MTR) を PBS に加え濃度 $25 \mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ とし、超音波処理を 15 分間行った。この溶液に $10 \mu\text{g}$ の糖質化合物 (またはその蛍光ラベル化物) を加え、さらに 15 分間超音波処理を行い 30 分間インキュベートした。その後、遠心分離 ($14,000 \text{rpm}$, 10min) により MWNT を底に集め、PBS × 3 回による洗浄を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察を行うため MWNT 凝集体を少量の PBS に超音波を使用せずに分散させ、一部をスライドガラス上へ滴下し乾燥を防ぐためカバーガラスをした。CLSM 観察は、スライドガラス上で MWNT の凝集体を探し、レーザー透過像 (488nm アルゴン)、FITC 像 (ex 488nm Ar, em $515\text{-}565 \text{nm}$)、Rhod 像 (ex 543nm He-Ne, em 590nm 以上) を得た。

MWNT/糖質化合物とレクチンの相互作用

少量の MWNT (NanoLab または MTR) /糖質化合物を PBS に加え、(Rhod-または FITC-) RCA_{120} 、(Rhod- または FITC-) ConA を最終濃度 450nM

となるように加えた。1 時間インキュベート後、遠心分離 (14000rpm , 10min) により MWNT を集め、PBS × 3 回による洗浄を行った。上記と同様に溶液としたものを CLSM により観察した。

MWNT とレクチンの相互作用

MWNT (MTR) を PBS (+) に加え濃度 $25 \mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ とし、超音波処理を 15 分間行った。この溶液に Rhod- RCA_{120} または Rhod-ConA を最終濃度 450nM となるように加え、1 時間インキュベートした。その後、遠心分離 ($14,000 \text{rpm}$, 10min) により MWNT を集め、PBS × 3 回、 H_2O × 2 回による洗浄を行った。溶液としたものを CLSM により観察した。

－ CNF への糖鎖、タンパク質の吸着 －

人工糖質高分子およびタンパク質による CNF の表面修飾

CNF を PBS に加え濃度 $25 \mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ とし、超音波処理を 15 分間行った。この溶液に $10 \mu\text{g}$ の蛍光ラベル化人工複合糖質高分子 PVLA (または BSA、コラーゲン) を加え、さらに 15 分間超音波処理を行い 30 分間インキュベートした。その後、遠心分離 ($14,000 \text{rpm}$, 10min) により CNF を底に集め、PBS × 3 回による洗浄を行った。溶液としたものを CLSM により観察した。

同様な修飾操作にて BSA Gold conjugate を相互作用させた CNF はコーティングせずに SEM にて表面観察を行った。

C. 研究結果

－ ろか膜上への固定化 －

図 1 には、 100mg の MWNT をろ過膜上へ固定し、乾燥後ろ過膜より剥がした MWNT 膜の写真を示した。図 2 および図 3 には、PC 製および PTFE

製ろ過膜に、MWNT を 200 μ g ろ過した膜の写真を示した。

図 5 および図 6 には、MWNT をろ過した PTFE 膜の SEM 像およびその強拡大像を示した。

－ MWNT 上でのアパタイトの析出 －

MWNT を人工唾液 (R-SBF) に浸し、2 週間静置後の MWNT 表面に析出する化合物を SEM にて観察した。MWNT (MTR 社製) を用いて析出させたときの場合を図 7 に示し、その凝集体の異なった地点を強拡大にて観察した結果を合わせて示した。また、特に MWNT から析出している様子が観察できた SEM 像を図 8 に示した。同様に MWNT (NanoLab 社製) を用いて析出させたときの場合を図 9 に示し、その凝集体の異なった地点を強拡大にて観察した結果を合わせて示した。

図 10 には NanoLab 社製 MWNT を R-SBF に 2 週間浸漬した後の MWNTs 凝集体表面の SEM 像を示した。浸漬前後での MWNTs 分散状態の観察の結果を図 2 に示した。図 11 (a) は PBS 浸漬後すぐに超音波処理し分散させた状態。図 11 (b) は、PBS 浸漬後、2 週間静置した状態。図 11 (c) は PBS 浸漬 2 週間後、攪拌した状態を示した。MWNT 上でのアパタイトの析出における擬似体液種の影響を検討した結果を図 12 および図 13 に示した。PBS (+) 中での析出における経時的変化の観察結果を図 14 および図 15 に示した。また PBS (+) 中での析出における基材の影響を観察した結果を図 16 から図 19 に示した。

－ 糖質による表面修飾 －

FITC-PVLA を MWNT (NanoLab 社製、MTR 社製) へ水溶液中で吸着させ精製後、CLSM にて MWNT

凝集体を観察した結果を図 20 に示した。次に、MWNT 表面に吸着した糖鎖の機能を調べるため、糖質高分子/MWCNT に対するレクチン結合試験を行った。図 21 には、FITC-PVLA/MWNT に対する Rhod-RCA₁₂₀ または Rhod-ConA の結合試験の結果を、図 22 には、PVLA/MWNT または PVCA/MWNT に対する FITC-RCA₁₂₀ の結合試験の結果を示した。また、レクチンの MWNT への非特異吸着を調べるため、はだかの MWNT と Rhod-RCA₁₂₀ および Rhod-ConA を相互作用させ CLSM にて観察した結果を図 23 に示した。

－ CNF への糖鎖、タンパク質の吸着 －

CNF へ蛍光ラベルした BSA を相互作用させ CLSM にて観察した結果を図 24 に示し、Gold ラベルした BSA を相互作用させ SEM 観察した結果を図 25 に示した。別のタンパク質として蛍光ラベル化コラーゲンを用いて CNF と相互作用させ CLSM 観察した結果を図 26 に、および蛍光ラベル化 PVLA を相互作用させた結果を図 27 に示した。

D. 考察

－ ろか膜上への固定化 －

MWNT (NanoLab) 分散液を吸引濾過により濾過膜上への固定化を試みた。MWNT (NanoLab) を 100mg 用いた場合、濾過膜上に固定化した MWNT は濾紙からはがすことが可能となり、ある程度の強度を持った紙のような状態となった (図 2)。これは濾紙上で MWNT が濃縮されることにより MWNT 同士で物理的な結合 (ファンデルワールス力等) を起こし、そのために濾紙から壊れることなく剥がすことができる程度の強度を持つようになったと考えることができる。また濾過する MWNT の量を 50mg と少なくした場合、

濾紙よりはがす際に壊れてしまった。このことより、直径 3.5cm（現在使用している吸引濾過機の規格により）のペーパーを作る場合には、100mg 前後が適当であると考えられる。

次に、濾過する際の MWNT の量を減らして 200 μ g とし、薄い MWNT の層を持った濾過膜を作製した。図 4 は PTFE を用いた場合であり、表面に不均一なコート状態を示していた。一方、図 3 はポリカーボネート (PC) を用いた場合であり、表面は均一なコート状態を示していた。MWNT を固定化した PTFE 表面が不均一なのは、もともと PTFE 膜表面自体が不均一であることと、MWNT が 200 μ g 程度では、その不均一の構造を埋めることができないためと考えられる (図 5、図 6)。一方で、PC 膜表面は均一な平らな状態であり MWNT も均一な層を形成したと考えられる (SEM データ示さず)。

以上の結果より、吸引濾過という非常に簡単な方法により MWCNT の濾紙上への固定化を達成することができた。

— アパタイトによる表面修飾 —

生体親和性を持つ物質での MWNT 表面修飾を目指し、カルシウムイオンとリン酸イオンを含む溶液中からの MWNT 上での析出を検討した。

析出後の MWNT (MTR) の SEM 像 (図 7) では、主に 3 種類の構造物が観察された。観察場所 A では、明らかな結晶 (平均: 長さ 1 μ m、太さ 200nm) として観察され、放射状に密に結晶成長していた。観察場所 B では、観察場所 A の様な明らかな結晶は見られず、MWNT の形状が観察された。注意深く観察すると、チューブ表面にアモルファス状の物質が覆い尽くすことによりチューブが太くなっている状態が観察された。また、チューブ末端が特に丸く大きく成長

している像も多くのチューブで観察された。観察 C では、チューブを含んだ板状の物質が観察された (SEM 像では平面上であるため分りにくい)。板状物質に含まれるチューブの太さより推定すると厚さは 200nm 前後と考えられる。

さらに結晶の成長点を知るため、MWNT (MTR) から結晶が成長している箇所を探し SEM 観察した結果を図 8 に示した。これらの像からは、MWNT の表面にアモルファス様の物質が観察され、さらに MWNT をコアとし放射状に結晶が成長した様子が観察された。当初、MWNT の末端からの結晶成長が多く観察されるのではと予想していたが、チューブの途中の地点からの結晶成長が多く観察された。

続いて、MWNT の由来による結晶成長を観察するため、再結晶化後の MWNT (NanoLab) の SEM 観察を行った。MWNT (NanoLab) の SEM 像 (図 9) では、MWNT 凝集体の表面一面に結晶が成長している様子が観察された。生成している結晶の量は MWNT (MTR) の場合よりも多く観察された。さらに、MWNT (NanoLab) をコアとした結晶成長地点も同様に観察された。成長した結晶の大きさは、MWNT (MTR) の時よりも細いことが観察され、MWNT (MTR) の場合に観察された板状の物質は観察されなかった。また、MWNT (NanoLab) の場合、結晶はチューブに対して放射上に析出したものと、チューブに沿っているように析出しているよう思われた。析出の機構に関する詳細は、現在のところ不明であるが、MWNT の欠陥点から析出している可能性等が考えられる。

これらの結果より、再結晶化溶液に MWNT を浸しておけば MWNT をコアとした結晶成長が起こることが判明した。さらに、MWNT の由来の違いにより結晶の量、形状などが異なることが推測され、結晶成長がナノチューブの構造に敏感

である可能性が示唆された。

しかしながら、上記溶液（図10、11）では結晶の形態や析出率に再現性が低いため、さらに詳細な検討を行うこととした。

・擬似体液の組成

再現性の向上のため擬似体液組成の影響を検討することとした。擬似体液として試した種類として標準的な擬似体液 Standard Simulated Body Fluid、市販人工唾液 Saliveht (Artificial saliva)、使用頻度が高い擬似体液 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) および Dulbecco' s Phosphate-Buffered Saline (PBS (+)) を選択した。

MWNTs を加え 2 週間静置し SEM 観察を行った結果、今回検討した擬似液中では PBS (+) のみで明らかな析出が観察された（図12、13）。このことは擬似体液であれば全てが析出を起こすのではなく、溶液組成が重要であることを示している。また、R-SBF が過飽和に近い溶液状態であることから、同様に過飽和度が比較的高い PBS (+) のみに析出が起こったと考えられる。一方、PBS (+) への F 添加効果を比較した結果、F を添加すると MWNT をコアとした針状結晶として析出し、添加しないと MWNT を含んだアモルファス状の析出であることが分かった（図12a および b）。

・経時変化の検討

ここまでの析出では、十分析出平衡へ達するまたは近づくと考えられる 2 週間を基準にして検討を行ってきたが、2 週間では結晶が MWNT 凝集体のほぼ全ての表面に析出するため多くの情報を得ることができなかった。続いて PBS (+) を用いて経時変化を検討することとした。その結果、PBS (+) のみでは 1 日後の時点か

らフレーク状あるいはアモルファス状（微細な針状の可能性もあり）の析出物（図14）が観察されたのに対し、F を添加すると明らかな針状結晶（図15）が観察された。このことより、F の添加は結晶成長の方向制御に寄与していることが考えられ、針状結晶の析出のためには F 添加が重要であることが分かった。また、SEM 観察では解像度に限界があるため明らかではないが PBS (+) のみの析出初期（1 日後、2 日後）では微細な針状の形態で結晶成長している可能性がある。MWNT 特有のナノレベルでの析出である可能性があるため、今後透過型電子顕微鏡（TEM）などによるより解像度が高い観察が必要であると考えられる。

・基材の検討

上記析出が MWNT 特有であるかを検討するため、析出させる基材を変化させその影響を検討した。はじめに、カバーガラス、Carbon Plate、酸処理チタン、カーボンファイバー、MWNT (MTR)、MWNT (NanoLab)、SWNT を用い PBS (+) 中で 2 日間浸漬し析出を比較した。その結果（図16から図19）、カバーガラス、Carbonplate、カーボンファイバー、SWNT 表面では比較的少量の析出が観察されたのみであるのに対し、酸処理チタン、MWNT (MTR)、MWNT (NanoLab) では多くの析出が観察された。また F 添加 PBS (+) でも同様な傾向が観察された。特に両溶液中でのカーボン系基材では、Carbonplate = SWNT < MWNT (MTR) < MWNT (NanoLab) の順で析出量が多くなり、基材の微細構造や表面の化学的性質が敏感に影響し、エッジや適度な直径を持つことが析出に適していることが推測された。SWNT は一本一本のチューブでは 1.2 nm の直径を持つが、表面エネルギー的に不安定であり 100nm-200nm のバン

ドルを形成し安定化することが知られている。よって析出の場合も、このバンドル構造が大きく析出に影響していることが推測された。

－ 糖質による表面修飾 －

ポリスチレン型人工糖質高分子による MWNT の修飾

(1) ポリスチレン型人工糖質高分子とレクチンの相互作用

人工糖質高分子を用いて物理吸着により MWNT の表面修飾が可能であるか検討を行った。人工糖質高分子と MWNT を混ぜた場合における PVLA の MWNT への結合を明らかに観察するため、FITC ラベルされた PVLA である FITC-PVLA を用いて溶液中における蛍光顕微鏡観察を行った。MWNT/FITC-PVLA の CLSM 観察結果を図 20 に示した。MWNT (NanoLab) の顕微鏡観察場合、チューブ直径が細いためチューブの一本一本を観察することはできなかったが、MWNT (NanoLab)/PVLA の凝集体の輪郭に蛍光が観察された (図 20 上段)。MWNT (MTR) での観察では、チューブ直径が太いためさらに明確に蛍光が観察され、ナノチューブの長さに沿って密に蛍光が観察された。このことより、MWNT の表面に密に PVLA が結合していることが明らかとなった。MWNT と PVLA の結合は疎水性同士による相互作用と考えられるが、一般的に糖鎖自身は親水性が高いため MWNT とは結合しない、または弱い力でしか結合しないことが考えられる。よって、糖鎖による MWNT の表面修飾のためには、糖質高分子である PVLA を用いることにより容易に達成されることが明らかとなった。

続いて、MWNT/PVLA に関して、表面に結合させた糖鎖 (この場合、 β -ガラクトース) が生

物学的な認識シグナルとなるか検討するため、糖鎖を認識するシグナルであるレクチンを用いた結合実験を行った。初めに MWNT (MTR)/FITC-PVLA と蛍光ラベル化レクチンを相互作用させ、CLSM 観察した結果を図 21 に示した。MWNT (MTR)/FITC-PVLA と Rhod-RCA₁₂₀ (β -Galactose specific lectin) との相互作用では、Rhod-RCA₁₂₀ の蛍光がナノチューブの長さ方向にそって局在し、それは MWNT に結合した FITC-PVLA の局在と一致していた。一方、Rhod-ConA (α -Mannose or α -Glucose specific lectin) との相互作用では、Rhod-ConA に由来する蛍光は観察されなかった。これらのことは、MWNT の表面に存在する糖鎖が、相当するレクチンにより選択的に認識されることを示している。選択性は、MWCNT 表面の糖鎖を変えた場合にも観察され (図 22)、PVLA (β -ガラクトース末端を持つ) で修飾した MWNT は RCA₁₂₀ により認識されるが、PVCA (β -グルコースを持つ) でのものは認識されなかった。コントロール実験として、はだかの MWNT とレクチンの相互作用を同様に検討した結果 (図 23)、MWNT へのレクチンの吸着 (非特異吸着) が観察された。また異なる見方をすれば、先ほどの図 21 で観察された選択的な認識は、MWNT へ PVLA が密に吸着することによって起こり、レクチンの非特異的吸着を起こすスペースがない程に糖鎖が MWNT 表面を覆っていることを示している。別の言い方をすると、MWNT の表面の糖鎖は、認識シグナルとなるとともに、MWNT 表面への非特異吸着をブロックする役割も果たしていると考えられる。

以上の結果をまとめると、糖鎖で MWNT の表面修飾を行うためには、PVLA などの人工複合糖質高分子 (疎水性を持つ) を用いれば容易に達

成できることが示された。その結合は、PBS や H₂O での洗浄でははがれない程度に強く、また、PVLA は MWNT の表面にチューブの形に添って密に配置している。MWNT の表面の糖鎖は、相当するレクチンにより選択的に認識されるとともに、非特異的な吸着をブロックする働きを持っていることが明らかとなった。

－ CNF への糖鎖、タンパク質の吸着 －

上述を含め CNT がタンパク質やある種の分子を吸着することが知られている。そこでチューブ状でない形態を持っている CNF も同様に吸着により、表面修飾が可能か検討を行った。

はじめに一般的なタンパク質である BSA を用いて吸着を検討した。蛍光ラベルされた BSA を CNF と相互作用させ蛍光顕微鏡 CLSM にて観察した結果 (図 2 4)、CNF の凝集体表面に蛍光が観察された。次に、Gold ラベルされた BSA を用いて相互作用させ SEM 観察を行った結果 (図 2 5) では、CNF 一本一本の表面に BSA の吸着を示す形状や Gold 粒子 (直径 20nm) が観察された。続いて、繊維状のタンパクである Collagen を用いて CLSM 観察を行った結果 (図 2 6) や人工糖質高分子 PVLA を用いた結果 (図 2 7) でも同様に CNF 凝集体の表面に蛍光が観察された。

以上の結果より、MWNT と同様に CNF でもタンパク質を混ぜるのみで容易に CNF の表面修飾が可能であることが分かった。

E. 結論

－ ろか膜上への固定化 －

MWNT 上で細胞培養を行うため、ろ過膜上へ MWNT の固定化を検討した。PTFE 製や PC 製ろ過膜を用い MWNT 分散液をろ過したところ、MWNT はそれ自身で凝集しながらろ過膜上に固定化

されることが分かった。ろ過による固定化は操作が簡単であり、MWNT 濃度や種類も容易に変えることができ、細胞培養における MWNT の影響を検討するためには有効であると考えられる。

今後、MWNT (NanoLab) だけでなく、様々なカーボン材料 (MWNT (MTR)、SWNT、CNF) を用いた濾過膜の作製や、多数の濾過膜を同時に作製する方法が期待される。

－ アパタイトによる表面修飾 －

生体親和性の化合物で MWNT 表面の修飾を行うため、カルシウムイオンおよびリン酸イオン溶液中にて MWNT を核として析出させ、アパタイトによる表面修飾を検討した。その結果、MTR 社製および NanoLab 社製の両方で MWNT からの析出物が観察された。

MWNT 上でのアパタイト析出による表面修飾を検討した結果、適度な過飽和度を持つ擬似体液へ浸漬させることにより容易に修飾が達成され表面修飾法の一つとして析出を示すことができた。また、アパタイト析出の経時変化を検討した結果、約 1 日後より MWNT をコアとした結晶の析出が形成されはじめ、その後徐々に結晶が成長していく様子が観察された。検討した条件中で結晶の形へ大きく影響を与えるのは F 添加であり、F 添加にて針状に成長し、F 添加なしでフレーク状である傾向が観察された。析出量には、基材の影響が大きく適度な太さの直径を持つ MWNT 上での析出が最も多かった。以上の結果より、適度な MWNT は結晶析出において有利であり、ナノレベルで制御できる結晶成長の可能性が示唆された。MWNT の由来により結晶成長の微細形状が異なることが推測され、MWNT 特有の性質として興味を持たれる。

今後、MWNT コアとした結晶成長の再現性やアパタイト結晶のX線回折やTEM構造観察による構造解析を行うよてい必要がある。また MWNT をコアとした結晶成長は、アパタイト以外の結晶にも応用が期待される。

－ 糖鎖、タンパク質による表面修飾 －

MWNT のバイオ分野でのさらなる応用のため糖鎖による MWNT 表面修飾を目指した。

ポリスチレン型人工糖質高分子を用いた場合、MWNT 表面は密に糖鎖で覆われた。また表面の糖鎖は相当するレクチンにより選択的に認識された。糖鎖で MWNT の表面修飾を行うためには、PVLA などの人工複合糖質高分子(ポリスチレン骨格を持つ)を用いれば容易に達成できることが判明した。PVLA の結合は、PBS や H₂O での洗浄でははがれない程度に強く、また、PVLA は MWNT の表面にチューブの形に添って密に配置している。MWNT の表面の糖鎖は、相当するレクチンにより選択的に認識されるとともに、非特異的な吸着をブロックする働きを持っていることが明らかとなった。これらのことより、糖鎖修飾 MWNT が細胞を扱う条件下においても有用に機能する可能性が高いと考えられる。さらに MWNT/糖鎖は、ナノチューブ表面へ糖鎖を密集させて結合させることができるので、糖鎖シグナルとしては増強(糖鎖のクラスター効果)されている利点が期待される。

続いて、吸着による表面修飾法の適用範囲を広げるため CNF をカーボン材料として検討を行った結果、MWNT と同様に容易に修飾できることが明らかとなった。この吸着法は、共有結合を形成させる化学的反応ではないので、カーボン材料系に広く適用でき有用であると考えられる。しかしながら、共有結合に比較し結合力が

弱いために修飾物の使用目的によっては不利になると考えられる。今後は、化学的な共有結合による修飾法を適用可能にし、目的により要求される性質を満たす修飾法の展開が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

- 1) ○赤坂 司、宇尾基弘、田路和幸、亘理文夫：人工複合糖質高分子によるカーボンナノチューブの表面修飾：第 24 回日本糖質学会年会(横浜、2003 年 6 月 29 日～31 日)、同講演予稿集、p. 125、2003
- 2) ○赤坂 司、宇尾基弘、田路和幸、亘理文夫：人工複合糖質高分子によるカーボンナノチューブの表面修飾：第 42 回日本歯科理工学会学術講演会(盛岡、2003 年 9 月 19 日～20 日)、歯科材料・器械、Vol22(5)、p. 397、2003
- 3) ○赤坂 司、田村一央、亘理文夫：カーボンナノチューブを用いた培養基材の表面改質：第 25 回日本バイオマテリアル学会大会(大阪、2003 年 12 月 16 日～17 日)、同講演予稿集、p. 215、2003
- 4) ○Tsukasa Akasaka、Yoshinori Sato、Kazuyuki Tohji、Fumio Watari：Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition：The 26th Fullerene・Nanotubes General Symposium(Okazaki、January 7-9、2004)、p. 165、2004
- 5) ○赤坂 司、亘理文夫、佐藤義倫、田路和幸：カーボンナノチューブ表面のバイオミメティックコーティング：第 27 回フラーレン・ナ

ノチューブ総合シンポジウム(東京、2004年7月28日～30日)、同講演要旨集、p.201、2004

6) ○赤坂 司、宇尾基弘、亘理文夫
: バイオミメティックコーティングを用いたカーボンナノチューブの表面修飾: 平成16年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏季セミナー(郡山市、2004年7月31日)、同講演予稿集、p.10、2004

7) ○赤坂 司、宇尾基弘、大川昭治、菅原 敏、亘理文夫: バイオミメティックコーティングを用いたカーボンナノチューブの表面修飾: 第44回日本歯科理工学会(京都、2004年9月24日～25日)、同講演予稿集、2004

8) Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Yosinori Sato, Kazuyuki Tohji : Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition: 206 th Meeting of The Electrochemical Society (ECS) 、(Hawaii, October 3-8, 2004)、2004

9) ○赤坂 司、亘理 文夫: 複合糖質高分子によるカーボンナノチューブの表面修飾: 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004(つくば、2004年11月15日～16日)、同講演予稿集、p134、2004

10) Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Yosinori Sato, Kazuyuki Tohji : Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition : International Symposium of Tissue Response and Biomedical Application of Carbon Nanotubes, Nanofibers, and Nanoparticles (Matsushima, December 20, 2004)、2004

11) ○赤坂 司、宇尾基弘、亘理 文夫: バイオミメティックコーティングを用いたカーボンナノチューブの表面修飾

: 第17回代用臓器・再生医学研究会(札幌、2005年1月28日)、2004

12) Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Yosinori Sato, Kazuyuki Tohji : Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition : International Symposium Cell Processing Engineering (Sapporo, February 4, 2004)、2004

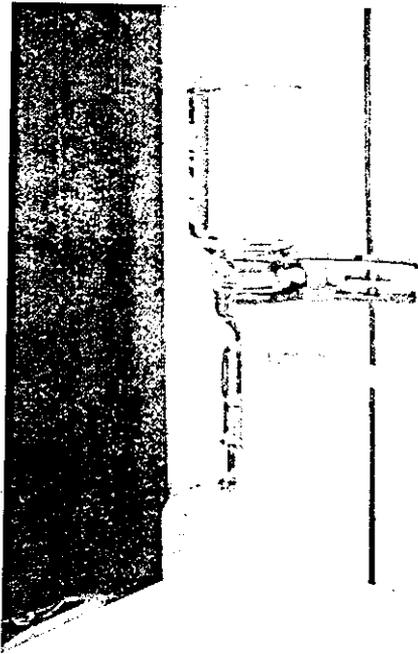


図1 吸引ろ過装置

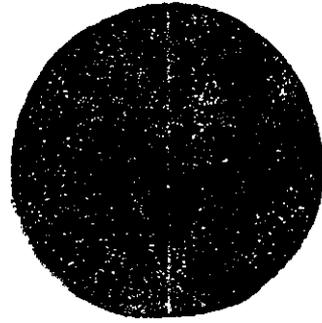


図2 MWNT膜 (MWNTのみ)

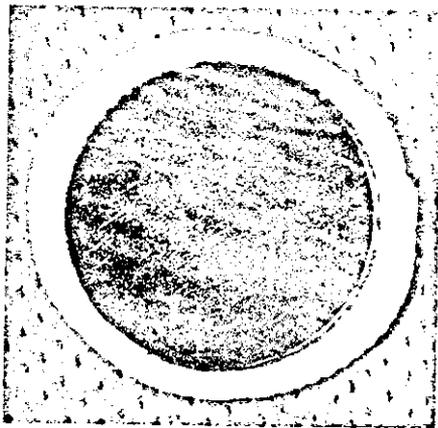


図3 MWNT膜 (PC)

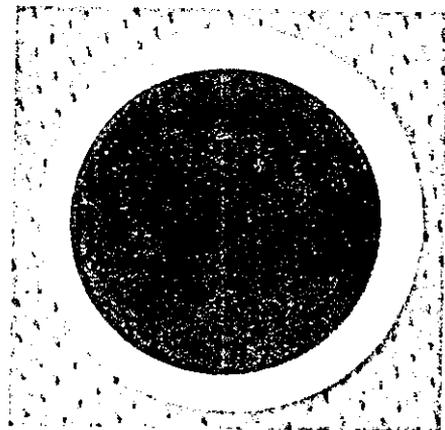


図4 MWNT膜 (PTFE)

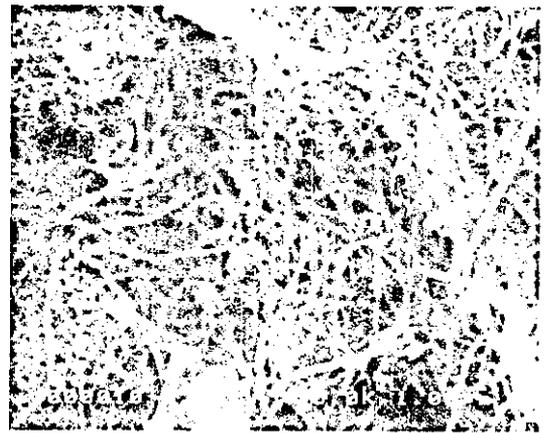
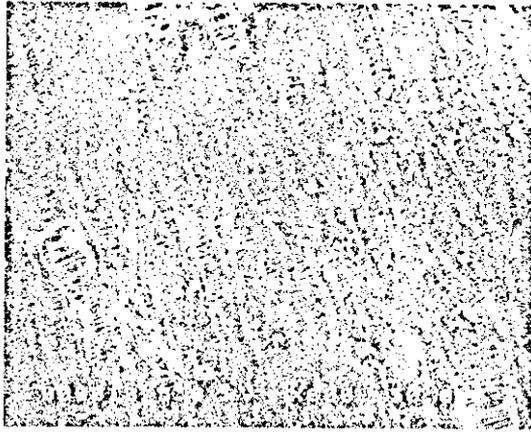


図5 PTFE膜上のMWNTのSEM像 図6 PTFE膜上のMWNTのSEM像(強拡大像)

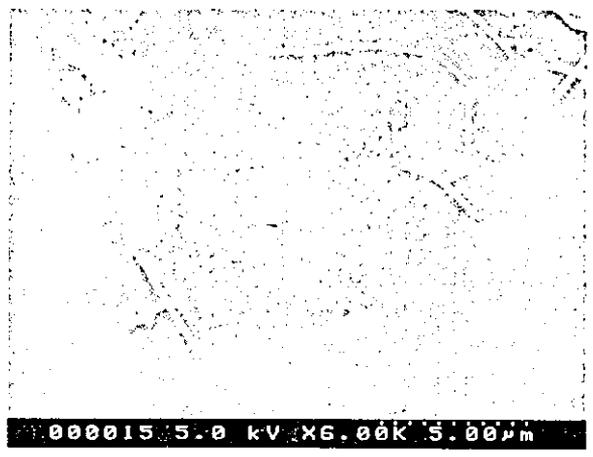
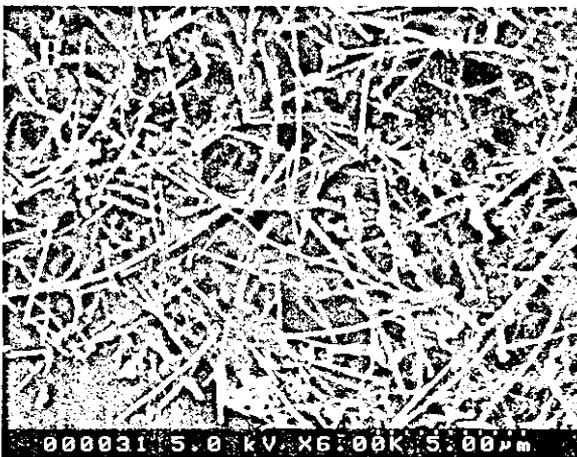
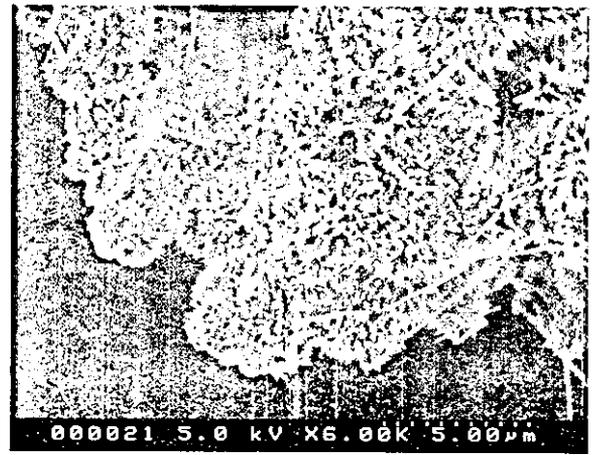
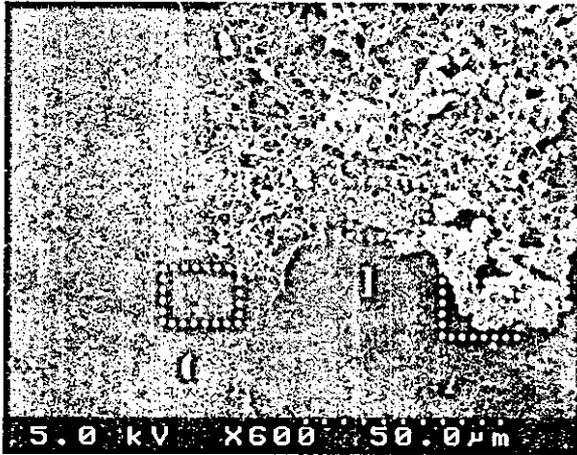


図7 MWNT(MTR社製)を核とした析出物のSEM像

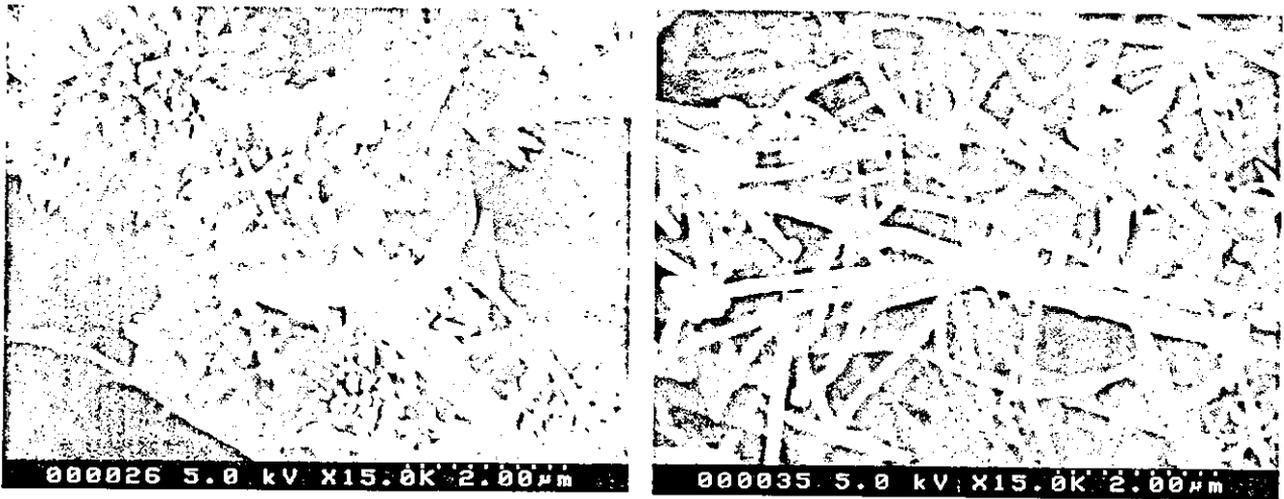


図8 MWNT(MTR社製)を核とした析出物のSEM像(強拡大像)

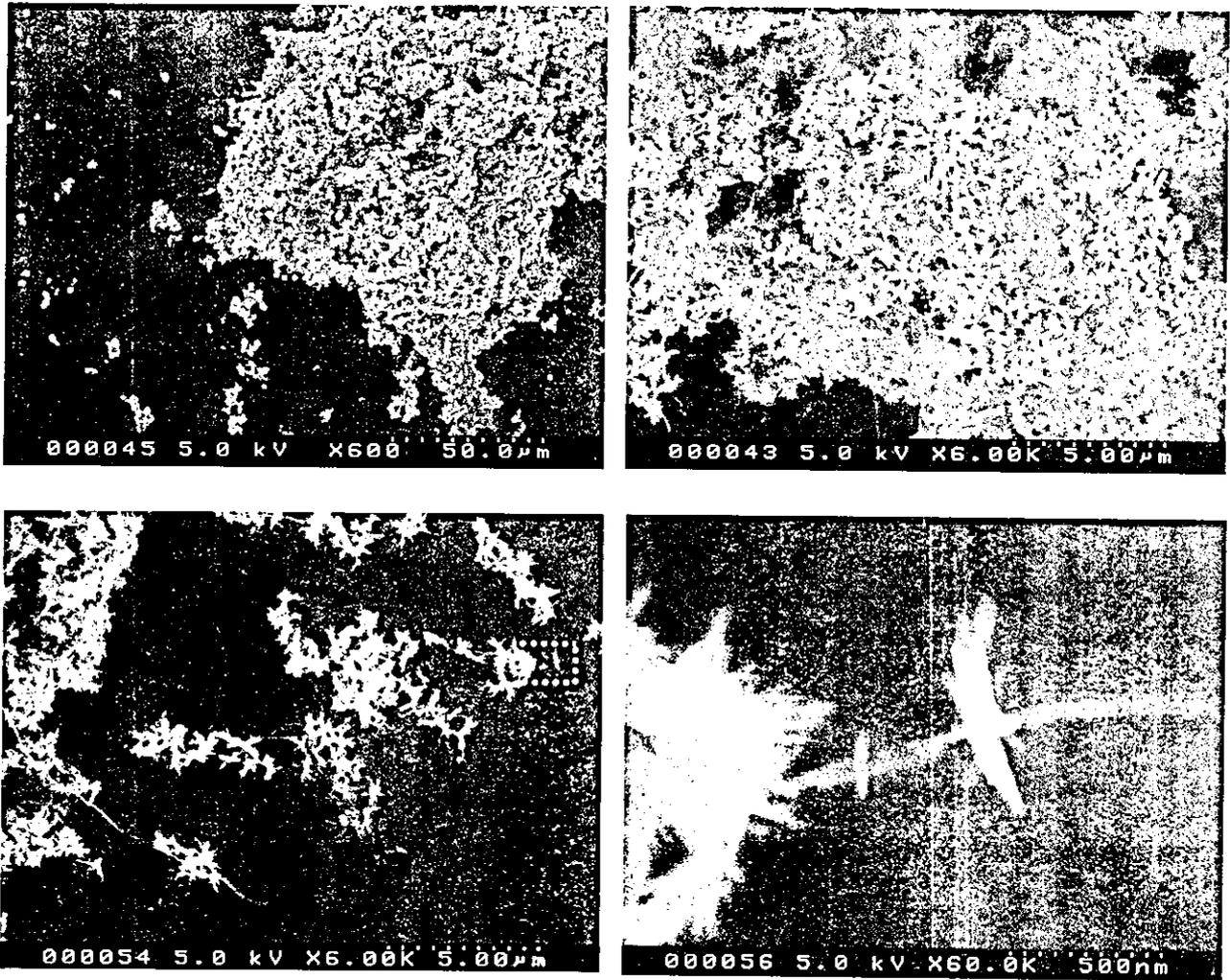


図9 MWNT(NanoLab社製)を核とした析出物のSEM像

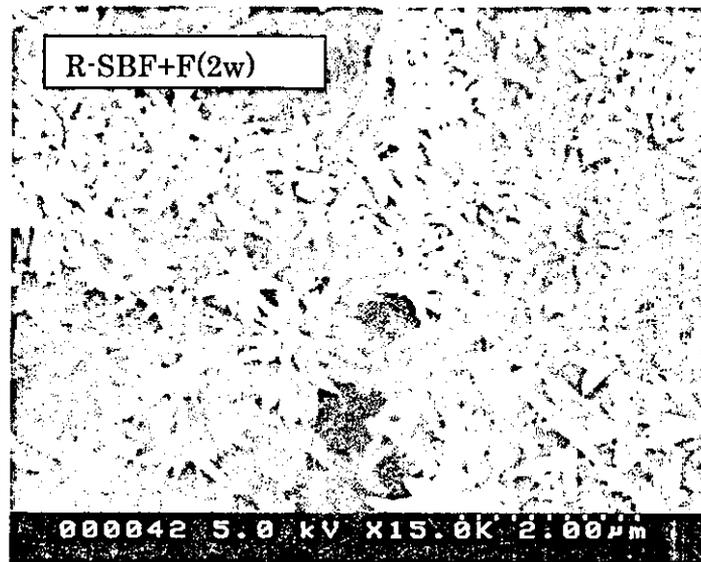


図10 R-SBF処理したMWNTs (NanoLab) 表面での析出 (SEM像)

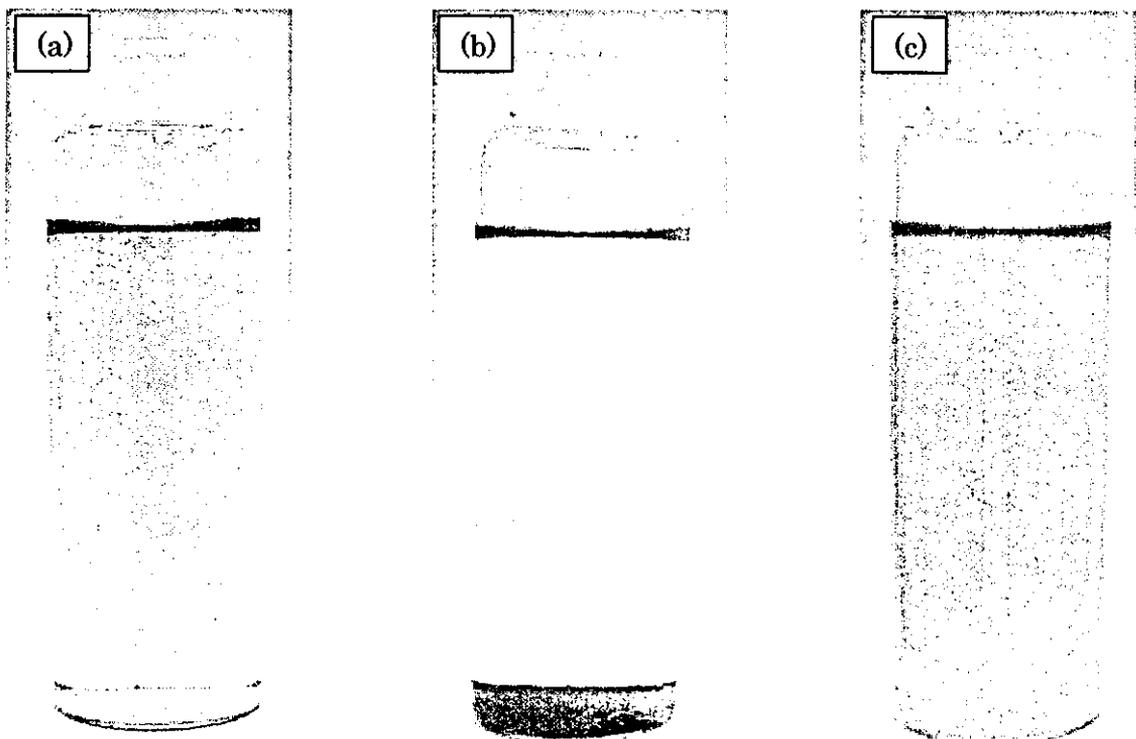


図11 PBS (またはF添加) で処理したMWNTs分散状態の観察 (2週間)
(a)PBS浸漬後、すぐに超音波処理、(b)PBS浸漬後、2週間静置、(c) PBS浸漬2週間後、
攪拌