

図 1 2 擬似体液の種類による MWNT 表面での析出状態の SEM 観察（浸漬 2 週間）
 (a) PBS(+), (b) F 添加 PBS(+)

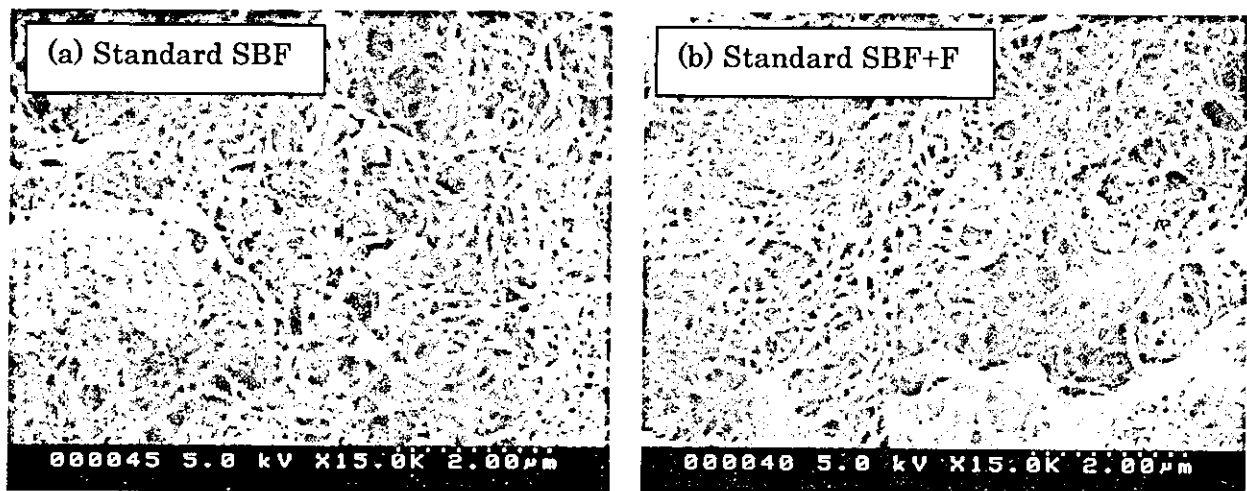


図 1 3 擬似体液の種類による MWNT 表面での析出状態の SEM 観察（浸漬 2 週間）
 (a) SBF, (b) F 添加 SBF

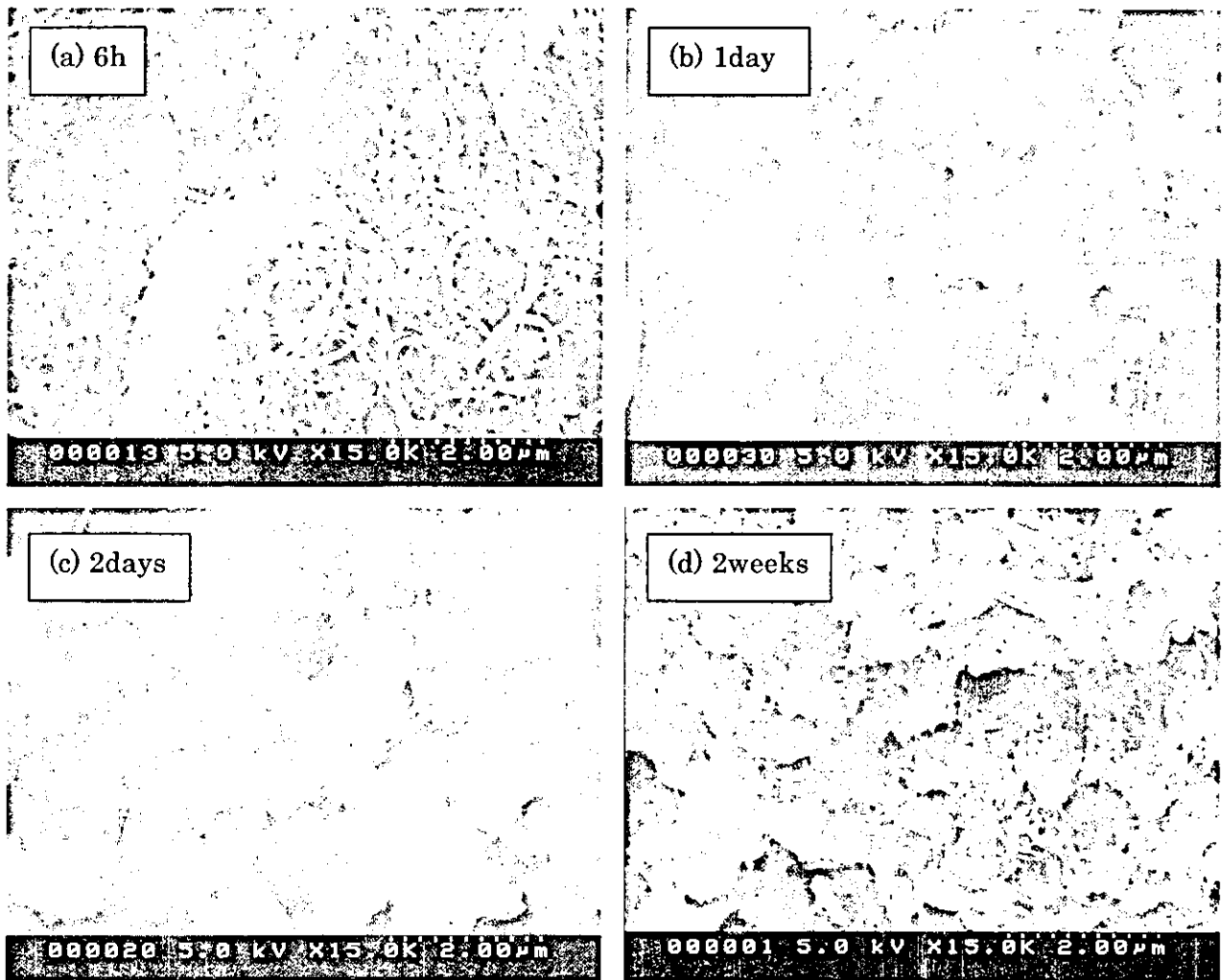


図1 4 PBS(+)で処理した MWNT 表面での析出の SEM 観察 (経時変化)
(a)浸漬 6 時間後、(b)浸漬 1 日後、(c)浸漬 2 日後、(d)浸漬 2 週間後

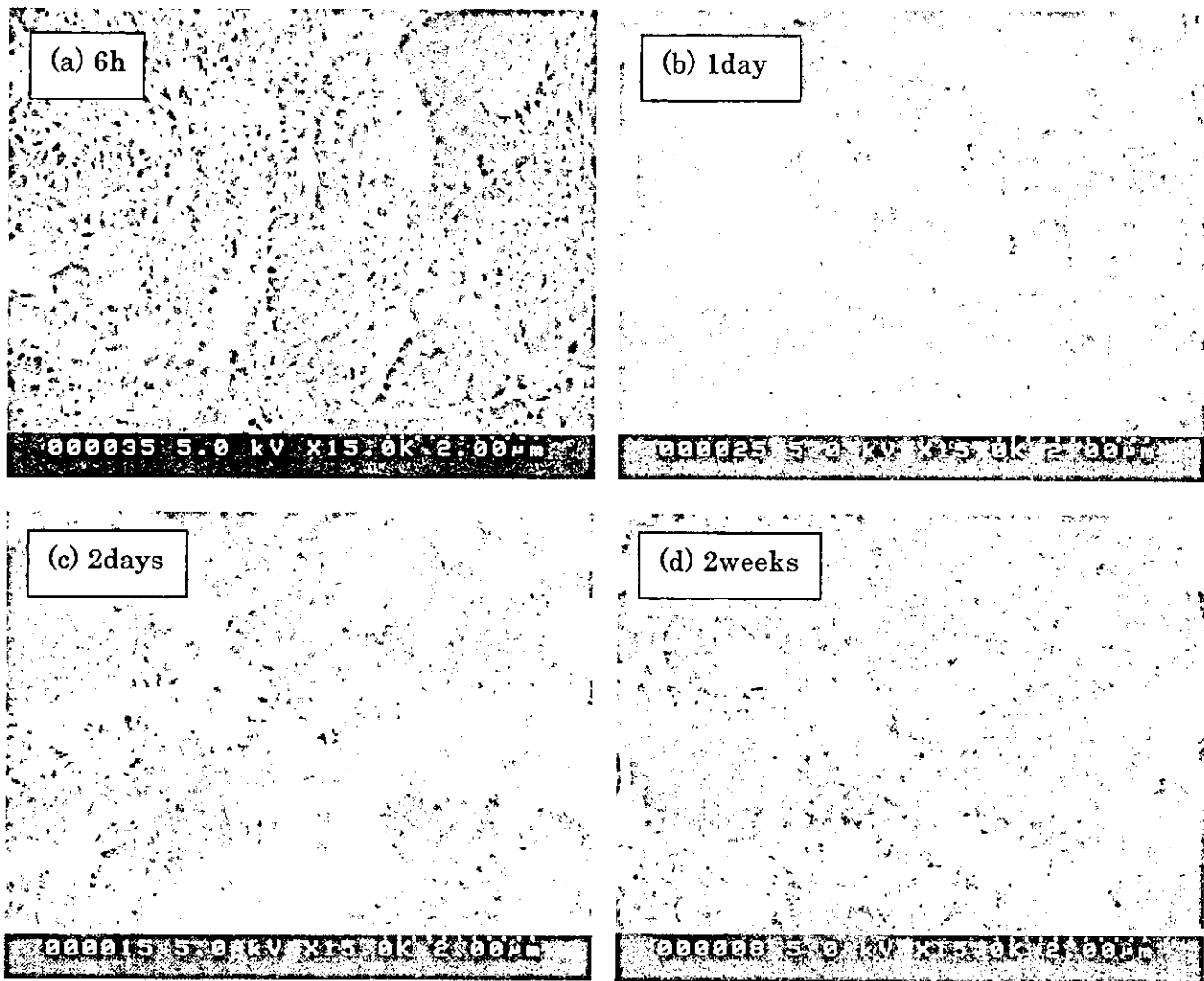


図15 F添加PBS(+)で処理したMWNT表面での析出のSEM観察(経時変化)
(a)浸漬6時間後、(b)浸漬1日後、(c)浸漬2日後、(d)浸漬2週間後

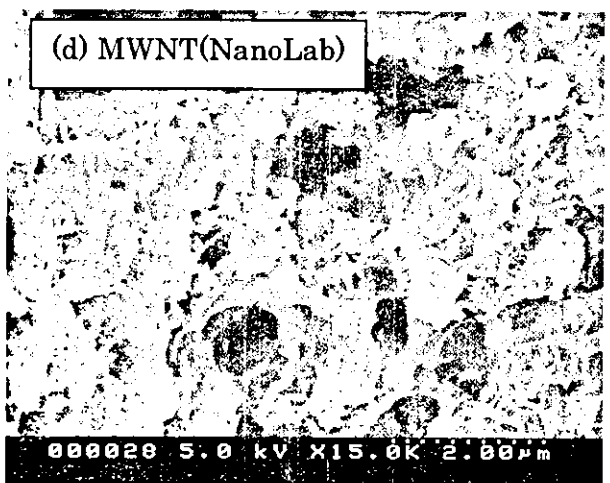
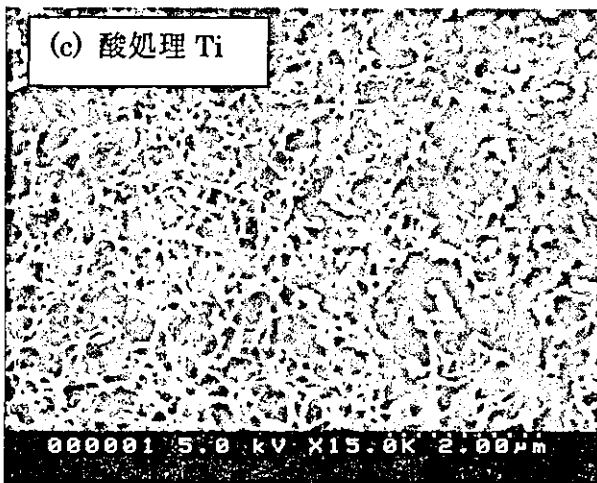
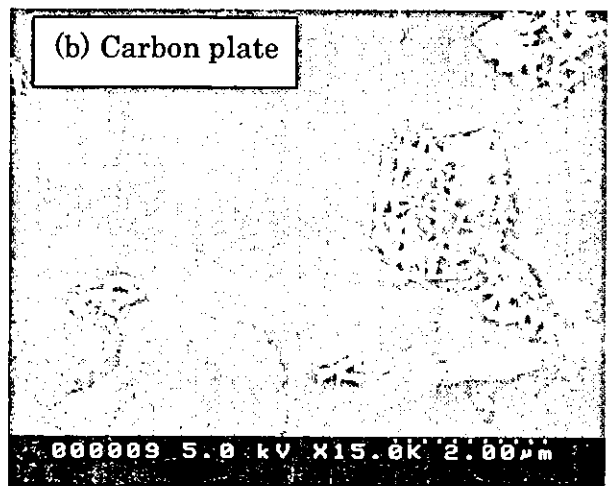
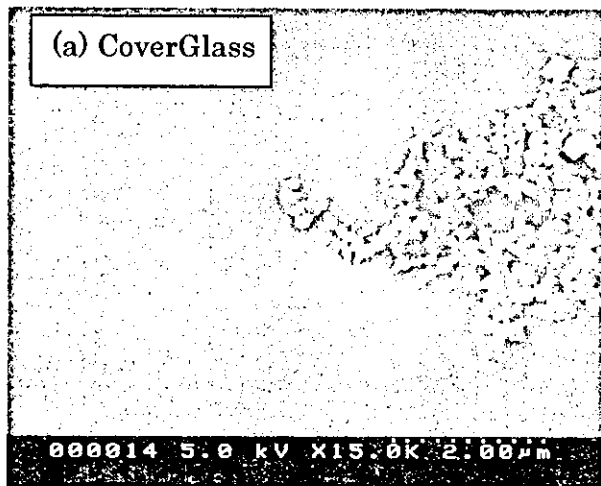


図16 PBS(+)で処理した MWNT 表面での析出の SEM 観察 (基材の影響)
(a) カバーガラス、(b) Carbon plate、(c) 酸処理チタン、(d) MWNT(NanoLab)

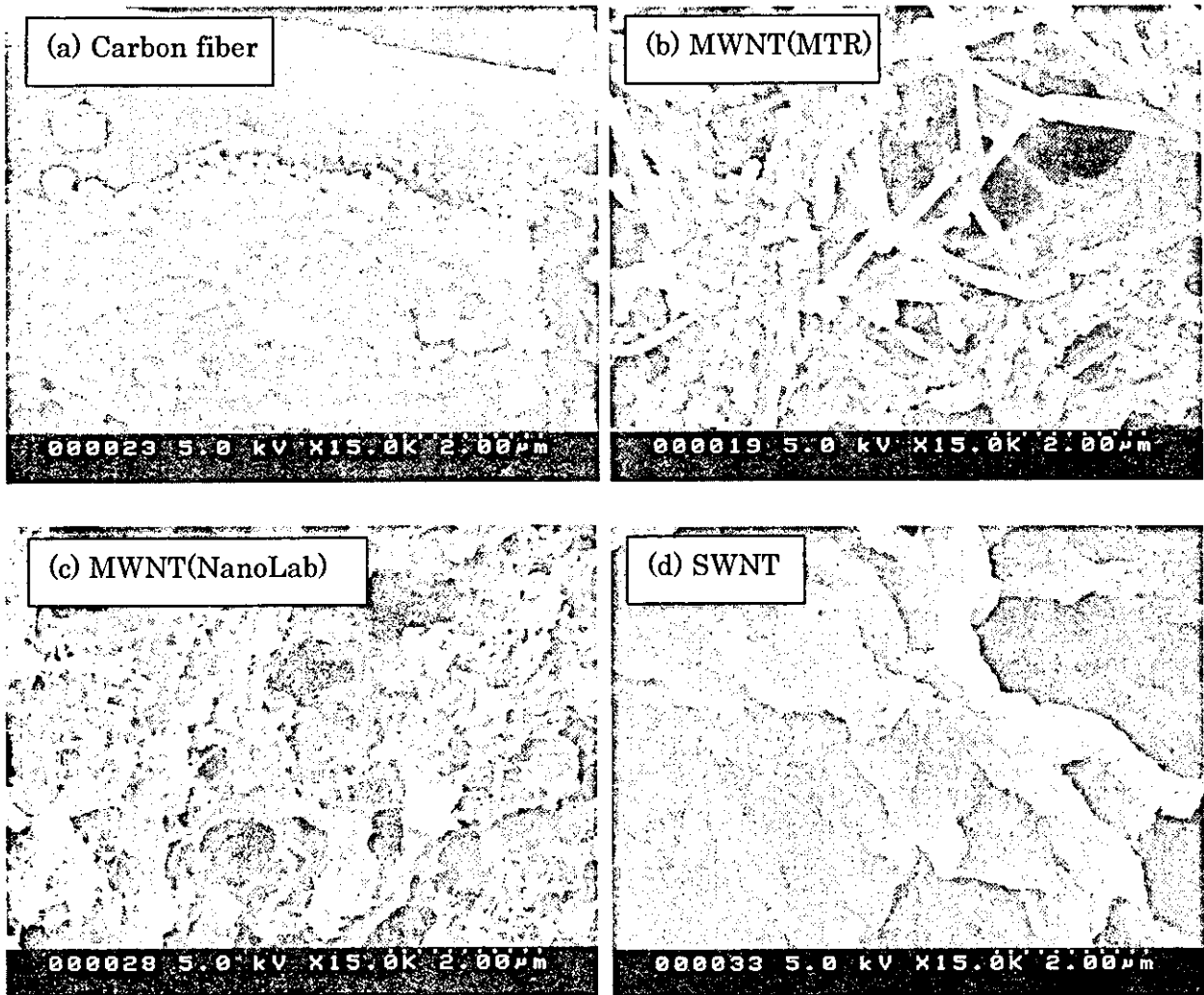


図17 PBS(+)で処理したMWNT表面での析出のSEM観察(基材の影響)
(a) カーボンファイバー、(b) MWNT(MTR)、(c) MWNT(NanoLab)、(d) SWNT

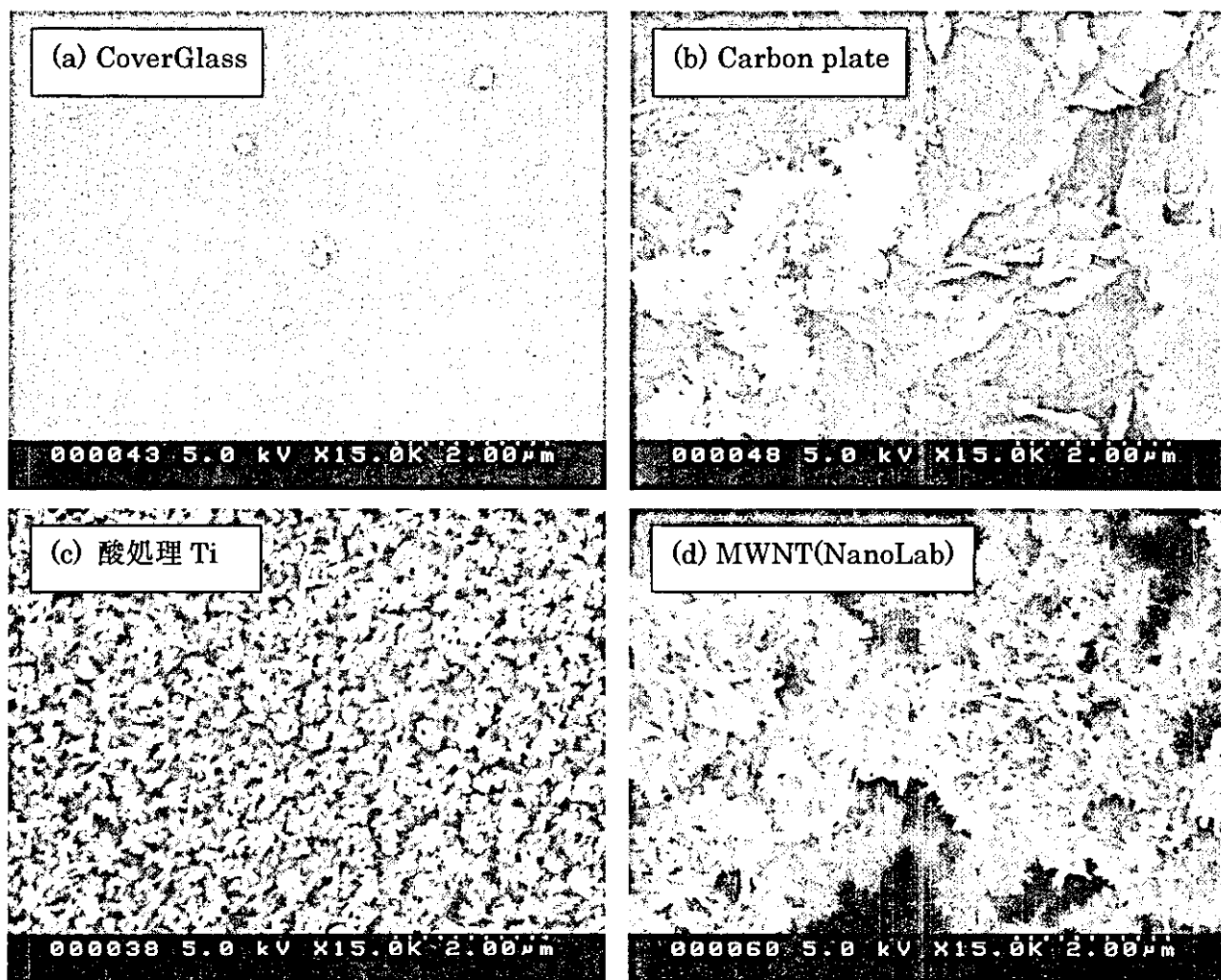


図18 F添加PBS(+)で処理したMWNT表面での析出のSEM観察(基材の影響)
(a) カバーガラス、(b) Carbon plate、(c) 酸処理チタン、(d) MWNT(NanoLab)

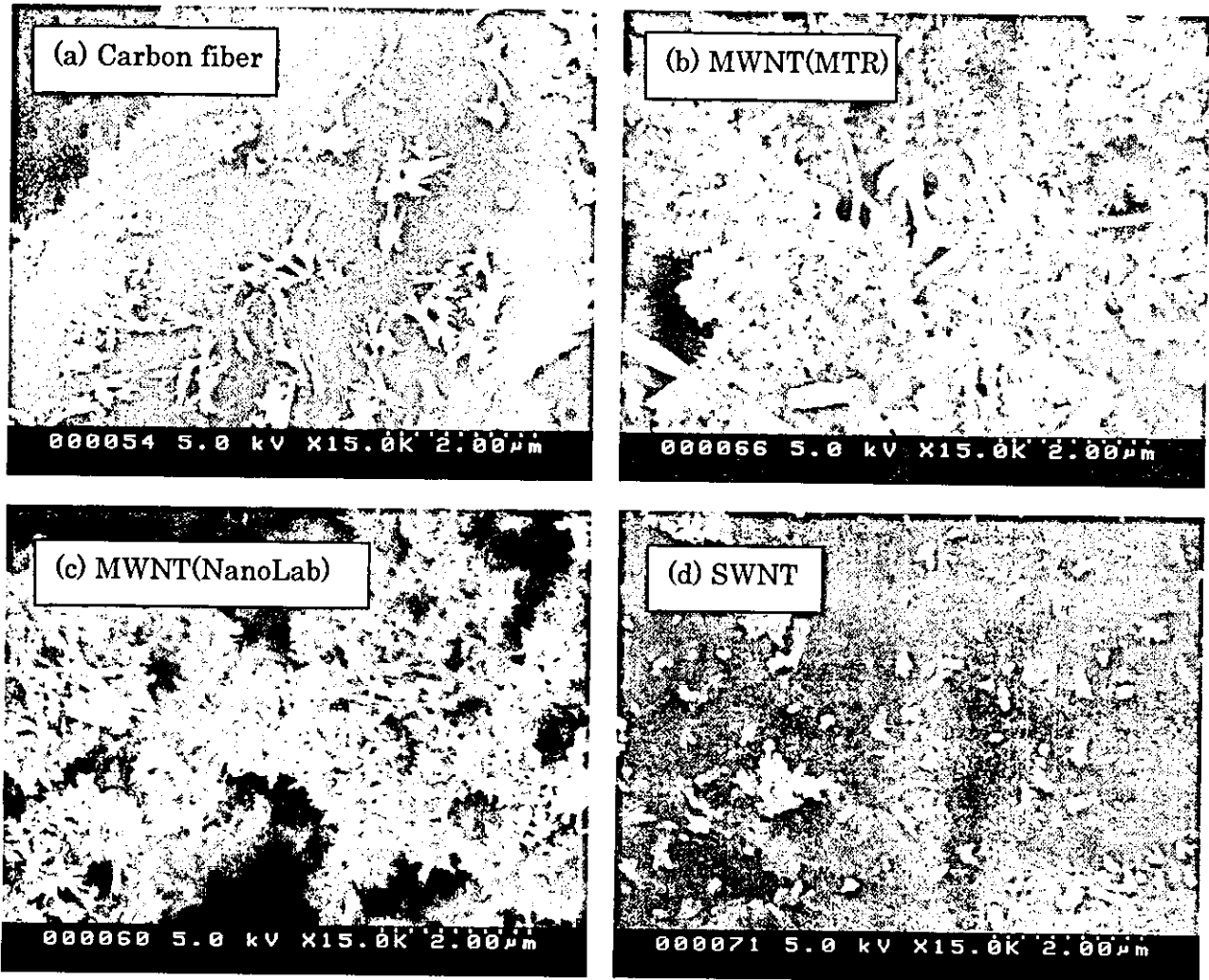


図19 F添加PBS(+)で処理したMWNT表面での析出のSEM観察(基材の影響)
(a)カーボンファイバー、(b)MWNT(MTR)、(c)MWNT(NanoLab)、(d)SWNT

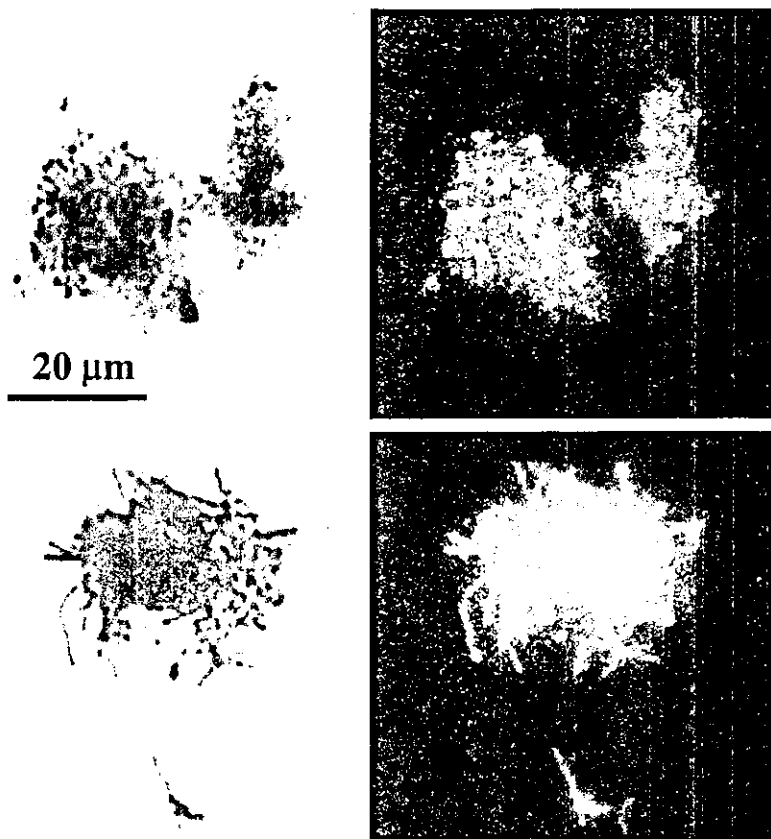


図20 FITC-PVLA処理後、MWNTのCLSM像
 (上段：NanoLab社製、下段：MTR社製、左：透過像、右：FITC像)

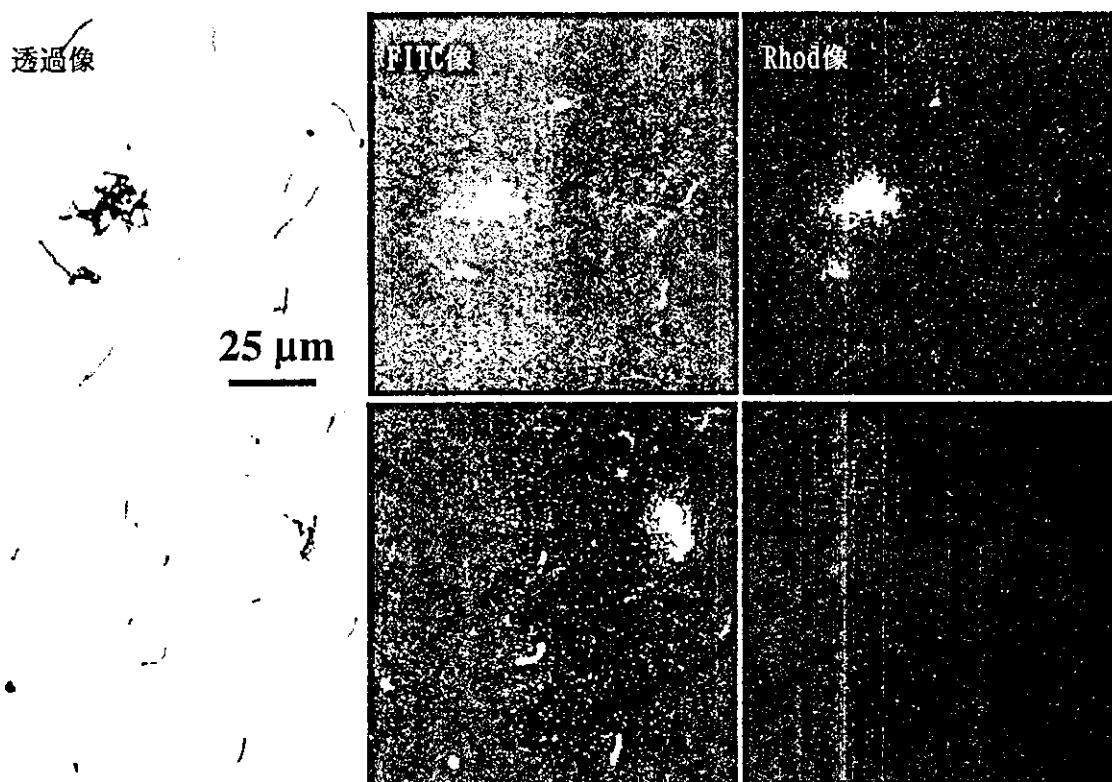


図21 FITC-PVLA/MWNTとレクチンの相互作用後のCLSM像
 (上段：Rhod-RCA120、下段：Rhod-ConA、左：透過像、中：FITC像、右：Rhod像)

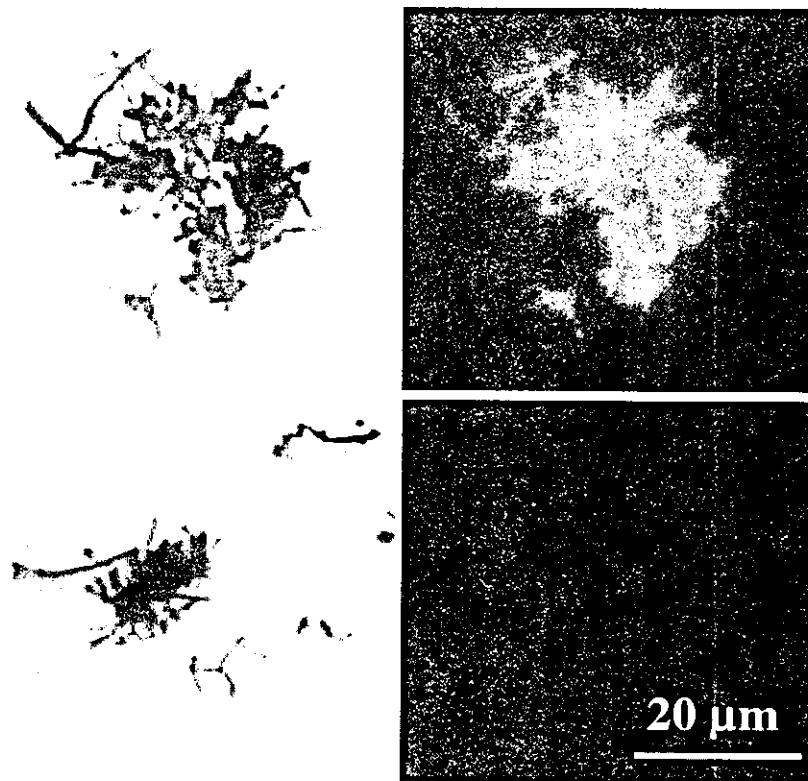


図 2 2 FITC-PVLA または FITC-PVCA/MWNT とレクチンの相互作用の CLSM 像
 (上段 : PVLA、下段 : PVCA、左 : 透過像、右 : FITC 像)

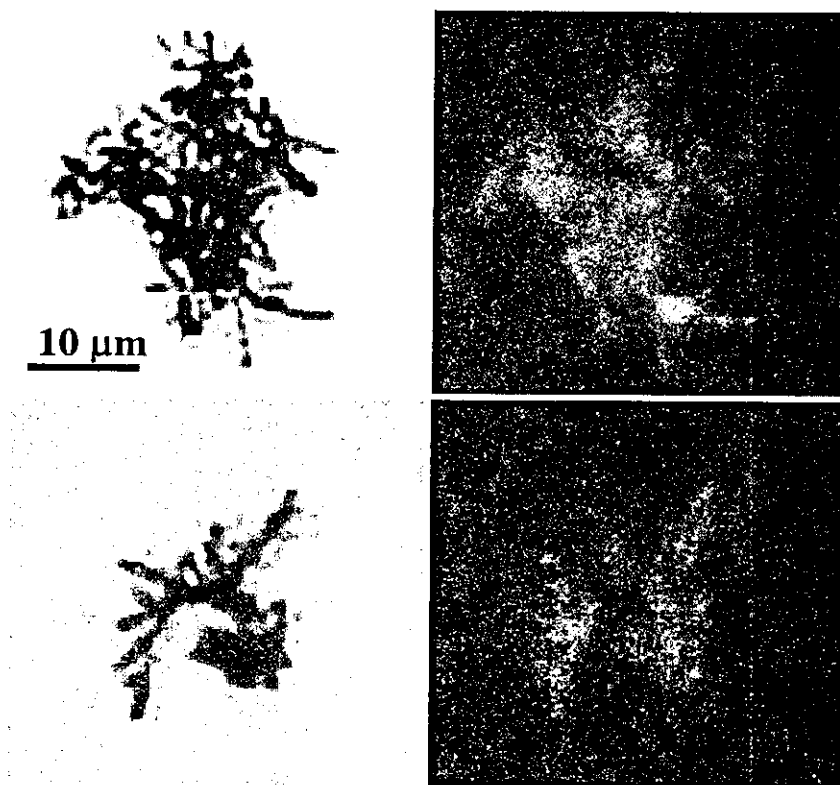


図 2 3 はだかの MWNT とレクチンの相互作用の CLSM 像
 (上段 : Rhod-RCA120、下段 : Rhod-ConA、左 : 透過像、右 : Rhod 像)

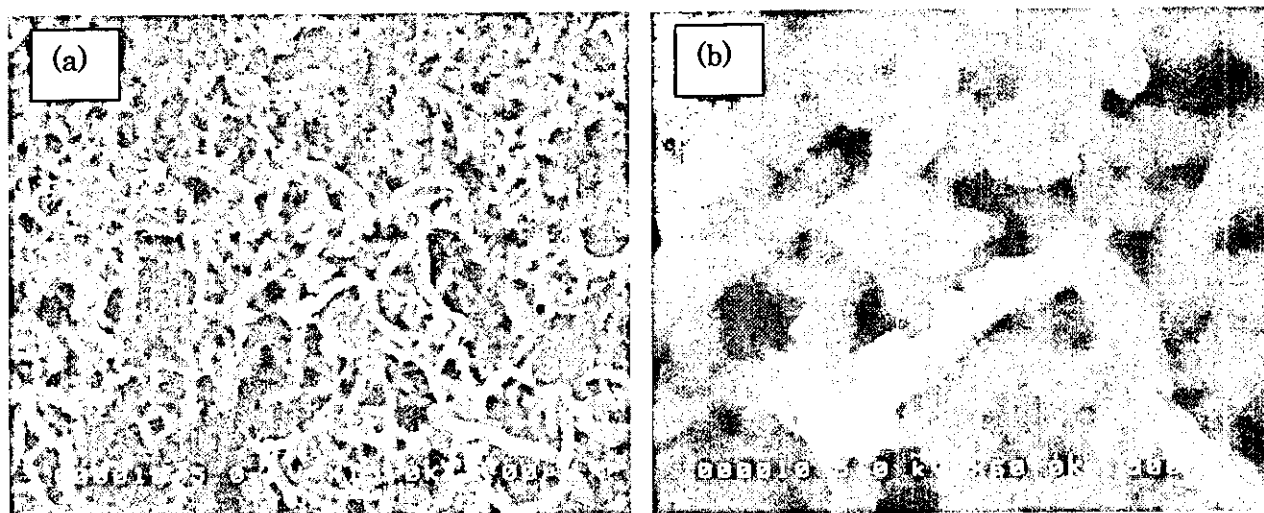


図 2 5 BSA-Gold と相互作用させた CNF の SEM
(a) CNF の SEM 像、(b) 強拡大像

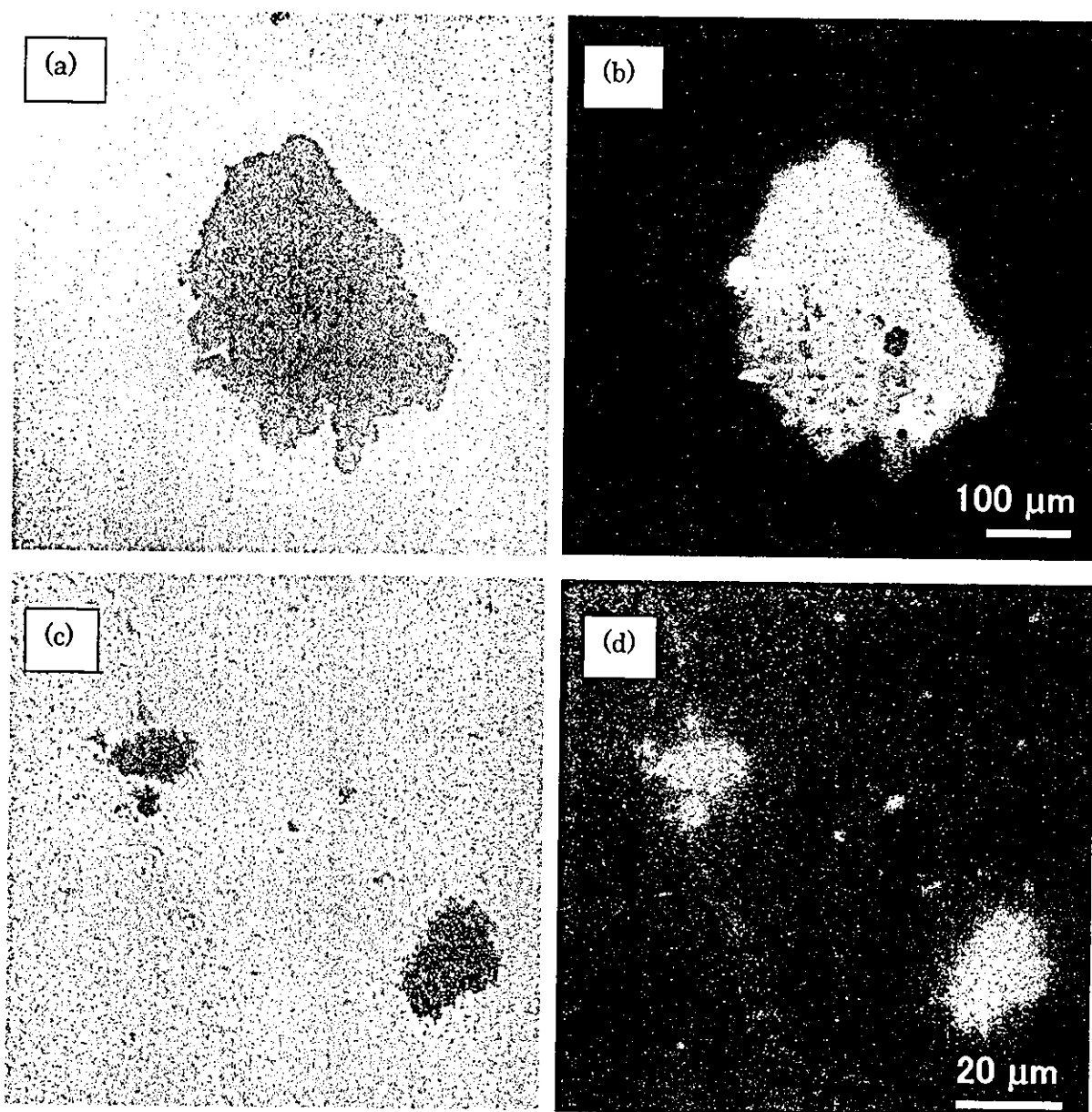


図 2 4 蛍光ラベル BSA で処理した CNF の CLSM 像
(a) (c) 透過像、(b) (d) 蛍光像

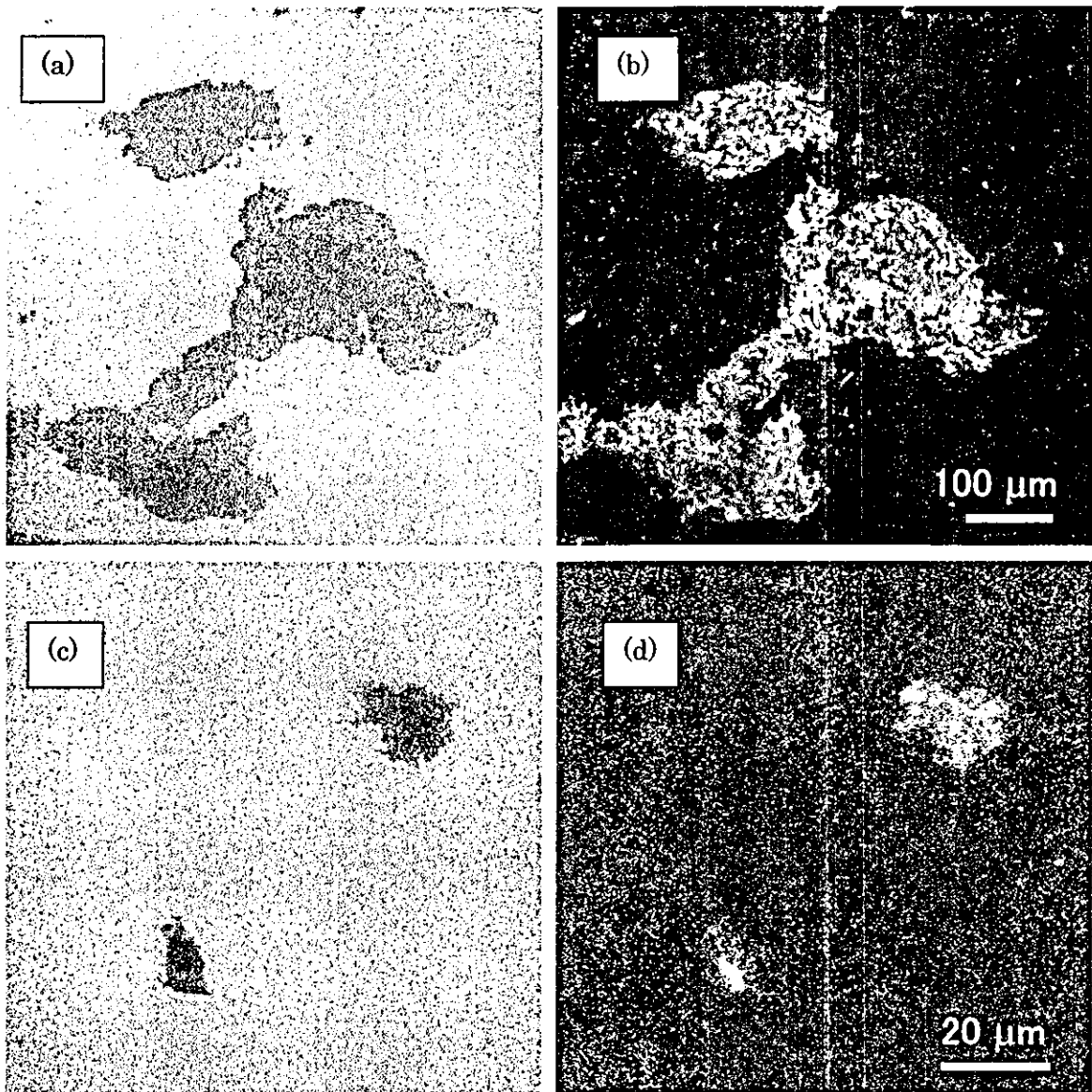


図 2 6 蛍光ラベル Collagen で処理した CNF の CLSM 像
(a) (c) 透過像、(b) (d) 蛍光像

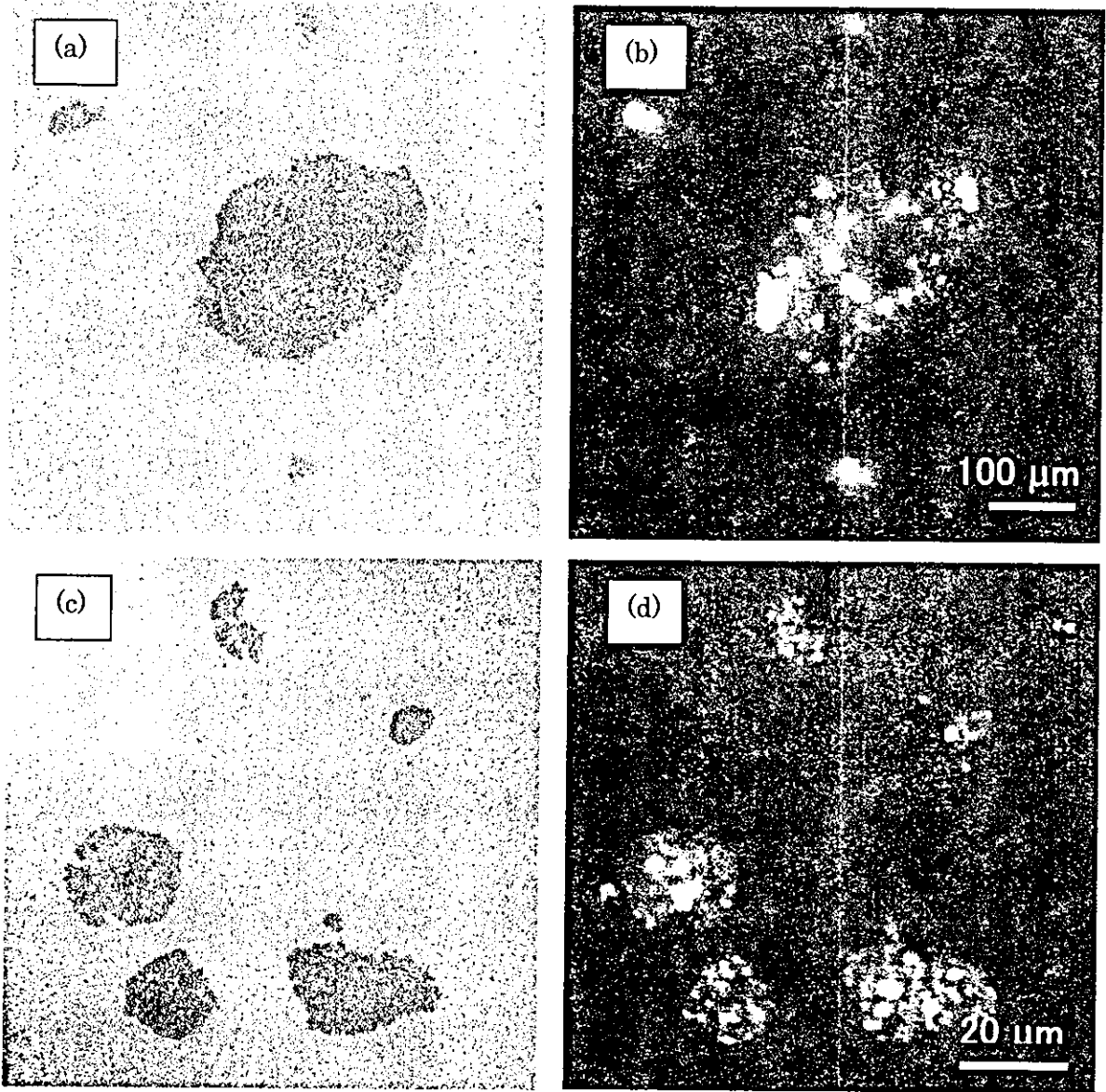


図 2 7 蛍光ラベル PVLA で処理した CNF の CLSM 像
(a) (c) 透過像、(b) (d) 蛍光像

研究報告書

カーボンナノチューブならびにカーボンナノロッドによるマクロファージならびにマウス脾臓細胞の活性化

研究協力者 柴田 健一郎 北海道大学大学院歯学研究科教授

カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブがヒト由来マクロファージ系細胞株である THP-1 細胞ならびにマウス脾臓細胞を活性化するかどうかを調べた。これらは共に THP-1 細胞ならびにマウス脾臓細胞を活性化し、TNF- α の産生を誘導する活性を有していたが、その活性は微生物由来リポペプチドならびにリポ多糖体に比べて非常に弱かった。

A.研究目的

リポ多糖体、リポタンパク質、ペプチドグリカンなどの微生物由来物質はマクロファージや樹上細胞表面に発現している Toll-like receptor (TLR) で認識され、炎症性サイトカインなどの産生を誘導し、免疫系を活性化する(1-4)。

本研究では、カーボンナノロッド(CNR)ならびにカーボンナノチューブ(CNT)が異物として自然免疫系で認識されるかどうかを明らかにすることを目的としている。

前回は、両イオン性界面活性剤で可溶化した多層 CNT ならびに CNR が人由来マクロファージ系細胞である THP-1 細胞を活性化することを報告したが、この活性化が使用した界面活性剤の影響ではないかという疑問が残った。そこで、今回は、界面活性剤を使用しない方法で処理した種々の CNT ならびに CNR が THP-1 細胞を活性化するかどうかを明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

1. サンプルならびにその処理方法

1) 東北大学の田路研究室で調製された以下のサンプルを用いた。

HSW2: 長さ数十 μm の精製 (純度 95%以上) 単層ナノチューブ

R102: ウニ型 SWCNTs の合成されていない煤

R2: ウニ型 SWCNTs

NGC3: CeC2 がグラファイト層に覆われた球状の粒子

817ND: ナノロッド

これらのサンプルを 6 N の塩酸処理 (R102, R2 以外) したのち、蒸留水に 0.2 mg/ml の濃度で分散させた。

さらに、以下のサンプルを用いた。

CNF: acid cut CNF 031003

NL2: acid cut NL2 MW 031003

ENL2: ET,ozon cut NL2 MW 031003

2) 古月等の方法で調製したサンプル

東北大学の田路研究室が作製した CNR (直径は 50-300 nm, 長さは, 2-20 μm) ならびに NANO LAB 社製の MWCNT (純度は 80%, 直径は 5-20 nm, 長さは 5-20 μm) をアルギン酸で可溶化した。

2. カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブによる単球系細胞株

(THP-1 細胞)の活性化

U 型の 96 穴のマイクロプレートを用いて、その 1 ウェルに 10% human serum を含む RPMI 1640 培地 200 μl 中に 5×10^5 個の THP-1 細胞を懸濁させ、カーボンナノロッド (原液 2 ppm) ならびにカーボンナノチューブ懸濁液 (原液 0.1 ppm) の原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液の 10 μl で 16 時間刺激した。遠心により上清を集め、ELISA 法で TNF- α 量を測定した。

3. マウス脾臓細胞の活性化

C57BL/6 マウスから脾臓を無菌的に取り出し、通常に従い脾臓細胞浮遊液を調製した。平底の 24 穴マイクロプレートに 1 ウェルに 1×10^7 個脾臓細胞を加え、原液 (最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、10 倍希釈液 (最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、100 倍希釈液 (最終濃度 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 16 時間刺激した。全 RNA を調製し、RT-PCR 法により TNF- α の mRNA の発現を調べた。

3. カーボンナノロッドの TLR2 による認識

THP-1 細胞から、ヒトの TLR2 遺伝子を RT-PCR 法により pEF6/V5-His TOPO (Invitrogen 社) ベクターにクローニングした (以後 TOPO-TLR2)。TOPO-TLR2 遺伝子を NF- κB 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (pNF- κB luciferase reporter

plasmid) とともに human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に遺伝子導入し、0.01 ならびに 0.1 ppm のカーボンナノロッドで 6 時間刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果ならびに考察

8 種類のサンプルの中で、HSW2 は最も強く THP-1 細胞を活性化し、TNF- α 産生を誘導した。しかしながら、そのレベルは微生物由来リポペプチド FSL-1 の 2000 分の 1 程度であった (図 1A)。他のサンプルも活性化能を有していたが、そのレベルは HSW2 に比べて非常に弱く、濃度依存性もみられなかった (図 1B)。

アルギン酸で可溶化した CNT ならびに MWCNT は、可溶化に用いたアルギン酸そのものが THP-1 細胞の活性化能を有していたために、CNT ならびに MWCNT の活性化を評価できなかった (図 2)。

HSW2、R102、R2、NGC3 ならびに 817ND が TLR2 に認識されるかどうかを調べたところ、これらはすべて TLR2 により認識されないことがわかった (図 3)。

さらに、生体防御において中心的な役割を果している免疫系に及ぼす影響を調べるために、今回はまずマウス脾臓細胞の活性化能を調べた。HSW2、R102、R2、NGC3 ならびに 817ND は、陽性コントロールとして用いた大腸菌 LPS よりは弱いものの、マウス脾臓細胞を活性化し、TNF- α の mRNA の発現を誘導し、そのレベルは HSW2 が最も強いことがわかった。また、その活性化能は濃度に反比例していた。このことは濃度が薄いほど良く分散しており、濃度が高いと凝集をおこしたためではないかと推測される。

以上の結果から、今回用いたサンプルは前回のサンプルに比べて、マクロファージ活性化能は弱く、

また、TLR2を介してNF- κ Bの活性化能を有していなかった。この相違は、サンプルの処理方法、分散している溶媒の種類ならびにサンプルのサイズ等の違いによるのかもしれない。

今回と前回の結果で共通していえることは、カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブは、微生物由来物質に比べるとその活性は非常に弱いながらも、単球・マクロファージを活性化する能力を有している。また、リンパ球が約 90%を占める脾臓細胞を活性化するということから、微生物ほどではないが、カーボンナノロッドならびにカーボンナノチューブは生体にとって異物として認識されるものと推測される。

文献

1. K. Shibata, A. Hasebe, T. Into, M. Yamada and T. Watanabe. The N-terminal lipopeptide of a 44 kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. **J. Immunol.** 165: 6538-6544, 2000.
2. M. Fujita, T. Into, M. Yasuda, T. Okusawa, S. Hamahira, Y. Kuroki, A. Eto, T. Nisizawa, M. Morita and K. Shibata. Involvement of leucine residues at positions 107, 112 and 115 in a leucine-rich repeat motif of human Toll-like receptor 2 in the recognition of diacylated lipoproteins and lipopeptides and *Staphylococcus aureus* peptidoglycans. **J. Immunol.** 171: 3675-3683, 2003.
3. Into T, Kiura K, Yasuda M, Kataoka H, Inoue N, Hasebe A, Takeda K, Akira S, Shibata KI. Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- κ B activation. **Cell. Microbiol.** 6:187-199, 2004.
4. T. Okusawa, M. Fujita, J. Nakamura, T. Into, M. Yasuda, A. Yoshimura, Y. Hara, A. Hasebe, Douglas T. Golenbock, M. Morita, Y. Kuroki, T. Ogawa and K. Shibata. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6. **Infect. Immun.** 72 : 1657-1665, 2004.

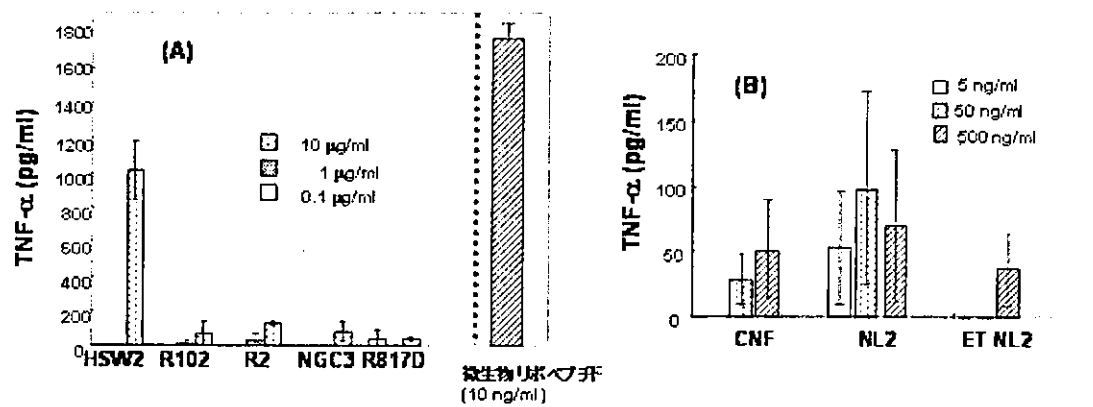


図1. THP-1 細胞のカーボンナノチューブならびにナノロッドによる活性化

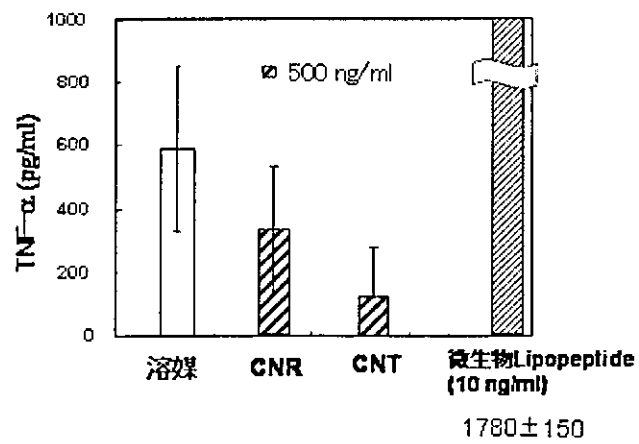


図2. アルギン酸で可溶化CNTならびに CNRによる THP-1細胞の活性化

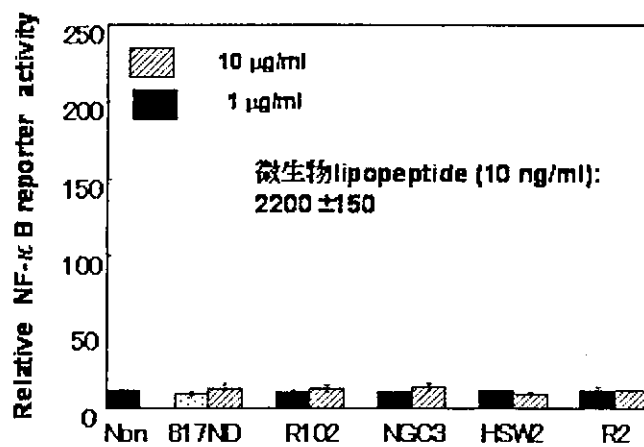


図3. TLR2を導入したHEK293細胞による転写因子NF- κ Bの活性化

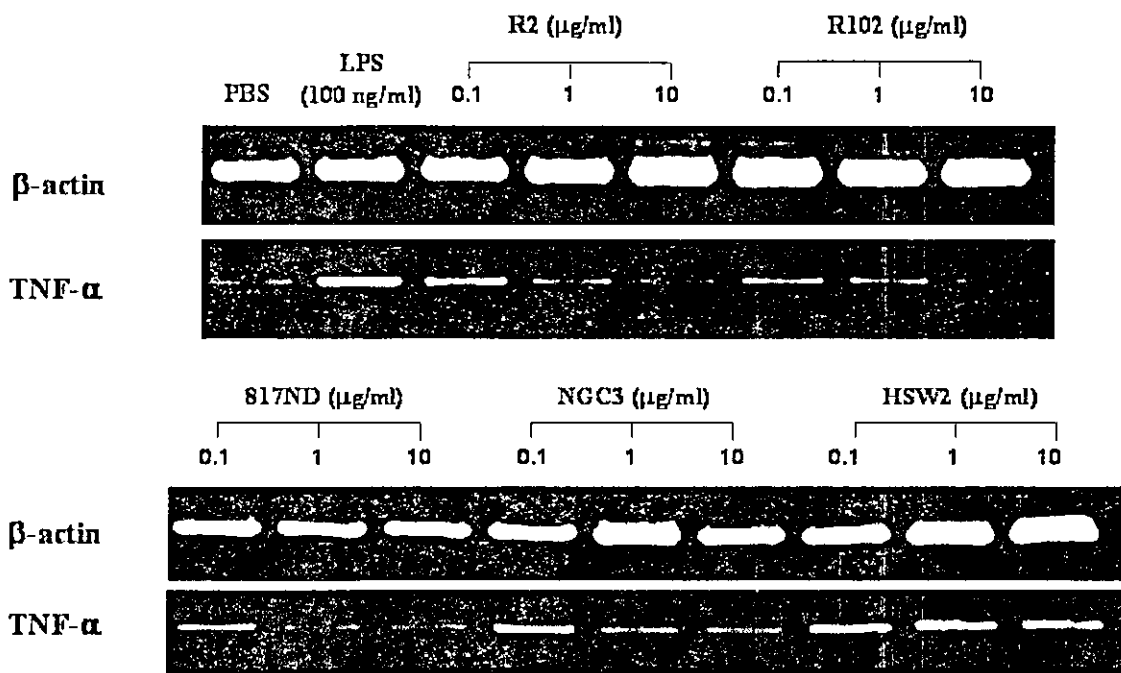


図4. マウス(C57BL/6)脾臓細胞からのTNF- α mRNAの発現誘導