

カーボンナノチューブによる細菌の吸着

主任研究者 亘理 文夫（北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座）

研究協力者 木浦 和人、柴田 健一郎

（北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座）

A. 研究目的

我々は、カーボンナノチューブ (CNT) が様々な物質を吸着するのではないかと推測している。そこで、本研究では CNT が全唾液あるいは細菌培養液中の細菌を吸着するかどうかを調べた。

B. 研究方法

1. CNT による全唾液中の細菌の吸着

全唾液をマイクロチューブに 1 ml ずつ分注し、CNT (NanoLab 社製の NWCNT, NO.4, 未精製品) をそれぞれ 5 mg、10 mg、20 mg を加え、vortex ミキサーで混合した。1 時間静置した後、上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^3 \sim \times 10^6$) 後、BHI 寒天培地に 100 μ l 塗抹し、15 時間後にコロニー数をカウントした。(fig.1)

2. CNT による *Streptococcus mutans* JC2 の吸着

BHI 液体培地に NWCNT を 5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml になるように加え、 4×10^6 cfu の *S. mutans* を接種し 37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。3、6、9、12、15 時間後に vortex ミキサーで 10 秒間混合し、1 分間静置してから上清を回収した。回収した上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^3 \sim \times 10^8$) 後、BHI 寒天培地に 100 μ l 塗抹し、48 時間嫌気培養後にコロニー数をカウントした。(Fig.2) また、15 時間後の培養液中の CNT を回収し、細菌と CNT との吸着の様子を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。(Fig.3)

3. CNT による *Escherichia coli* K12 の吸着

普通ブイヨン培地に NWCNT を 5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml になるように加え、 2×10^5 cfu の *E. coli* を接種し、37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。2、4、6、8 時間後に vortex ミキサーで 10 秒間混合し、1 分間静置してから上清を回収した。回収した上清を滅菌 PBS で 10 倍連続希釈 ($\times 10^5 \sim \times 10^{10}$) 後、普通寒天培地に 100 μ l 塗抹し、10 時間培養した後にコロニー数をカウントした。(Fig.4)

C. 結果ならびに考察

全唾液中の生菌数 (3.6×10^7 cfu/ml) は CNT の濃度依存的傾向を示し、最も高濃度 (20 mg/ml) の CNT 処理で生菌数が 2.6×10^6 cfu/ml まで減少していた。また、*S. mutans* ならびに *E. coli* の培養液に種々の濃度の CNT を加えたところ、CNT の濃度に依存して培養上清中の菌数が減少していた。実際、培養上清の透明度が CNT の濃度に依存して増していることが肉眼でも観察された。SEM の結果では、*S. mutans* が CNT のファイバーに入り込んでいる様子や菌体に CNT が絡みついている様子などが観察された。

以上のことから、CNT は細菌の菌体を吸着することができるものと推測される。

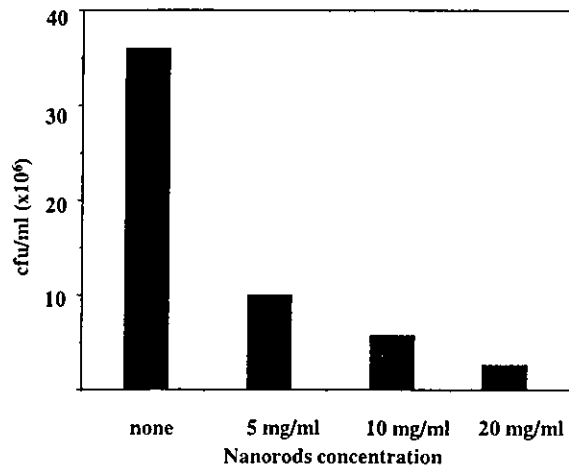


Fig.1 カーボンナノチューブによる全唾液中の細菌の吸着

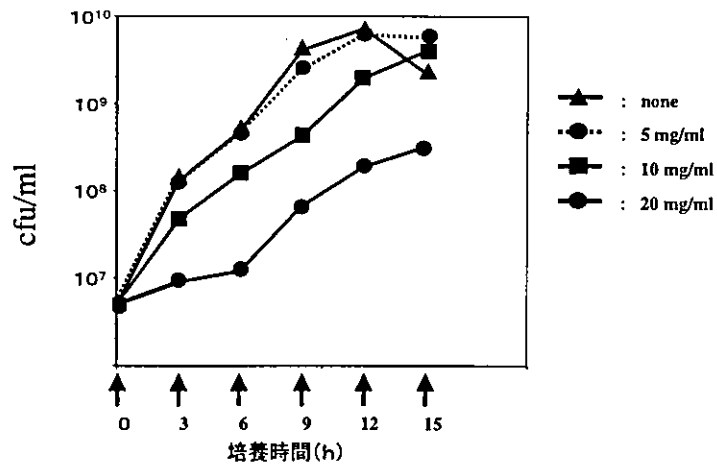


Fig.2 カーボンナノチューブによる*S. mutans*の吸着

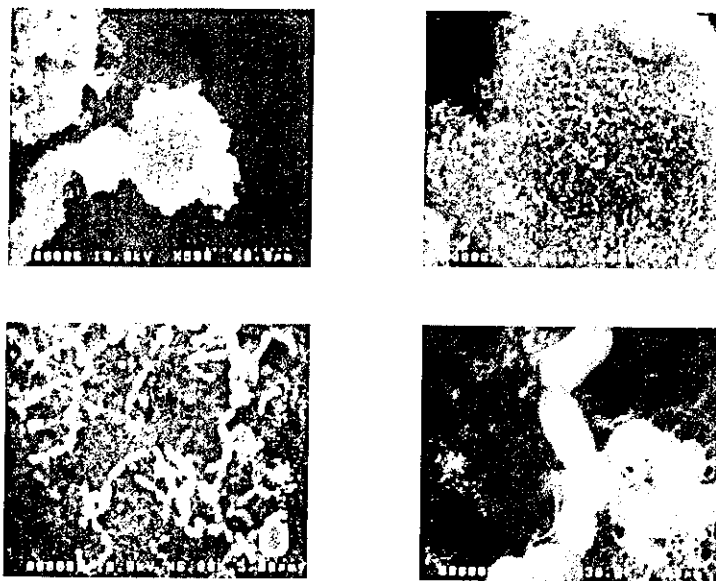


Fig.3 細菌とカーボンナノチューブとの吸着 (SEM)

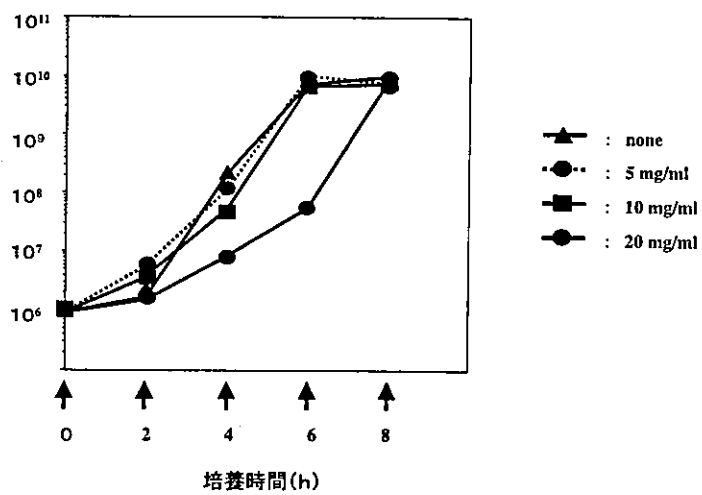


Fig.4 カーボンナノチューブによるE. coliの吸着

カーボンナノチューブ・ファイバーの細胞培養系 における細胞増殖活性ならびアルカリフォスファターゼに及ぼす影響

主任研究者 百理文夫 北海道大学大学院歯学研究科教授

研究協力者 田村正人 北海道大学大学院歯学研究科教授

研究要旨 本研究では、哺乳動物由来の筋芽細胞、骨芽細胞ならびに歯根膜細胞の細胞培養系を用い、いくつか異なる処理をしたカーボンナノチューブならびにファイバーの細胞に与える影響について調べ、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。サイズ制御した NL2_MW を C2C12 細胞に添加し培養したところ、ac_size_670nm では DNA 合成量ならびに生細胞数は、無添加のコントロールと比べて有意な差は認められなかった。ac_size_550nm もしくは ac_size_220nm を加えた場合、DNA 合成量と生細胞数が増加した。その増加の程度は 550nm に比べて 220nm では大きな値を示した。一方、MC3T3-E1 細胞においては、この細胞増殖活性に対する影響は見られなかった。また、医用ミニブタ歯根膜組織から分離した細胞をヒト telomerase 遺伝子の導入により不死化した異なる形質を有する歯根膜細胞の株間でカーボンナノチューブならびにファイバーのサイズならびに添加量により DNA 合成量が異なっていた。同様に、細胞のアルカリフォスファターゼ活性に対しても細胞間でカーボン分子のサイズならびに添加量により異なる反応が見られた。これらの結果から、あるサイズのナノチューブは細胞の増殖活性ならびにアルカリフォスファターゼ活性に対して影響を与えうることを、このカーボンナノチューブ・ファイバーの細胞に対する作用には細胞特異性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

生体を構成する元素としては炭素、酸素、水素、窒素、カルシウム、リンが主な構成元素であり、炭素は人体の構成元素組成の 50% を占める主要な元素成分である。従来からグラファイト、ダイヤモンド、無定形炭素の 3 つが炭素からなる同位体として知られている。しかし、近年 C60 フラーレンと呼ばれるサッカーボール状分子をはじめとした高次のフラーレンが次々と発見されてきた。また、筒状のナノスケール分子としてカーボンナノチューブが見出された。この炭素元素より成

るカーボンナノチューブを、生体へ何らかの形で応用するための基盤として、まずこれらの分子の生体に対する作用とその分子メカニズムを明らかにすることが必須である。

研究協力者の田村らは、鹿児島大学生命科学資源開発研究センター医用ミニブタ研究部門と共同で、歯周組織のひとつである歯根膜の機能を分子レベルで検討するためのモデル系を確立することを目的として歯根膜組織由来の培養細胞株を樹立することを試みた。この樹立した細胞株間においてさまざまな形質が異なっていた。そこで本研究ではこれらの

歯根膜細胞ならびに筋芽細胞ならびに骨芽細胞の細胞培養系を用い、いくつか異なる処理をしたカーボンナノファイバー・ナノチューブの細胞増殖活性ならびに細胞機能に与える影響について調べ、カーボンナノ/マイクロ微粒子の細胞に対する反応性の相違を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

<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 μ m_cake_CNFs_040207a (田路研製)
- e: PC_0.4 μ m_cake_CNFs_040207b (田路研製)
- f: PC_0.1 μ m_cake_CNFs_040207c (田路研製)
- g: acid_cut_NL2_MW_031003 (NanoLab 社製)
- h: ET_ozon_cut_NL2_MW_031003
(NanoLab 社製)
- i: acid_cut_CNF_MW_031003 (田路研製)

<方法>

【C2C12細胞ならびにMC3T3E1細胞の培養】

マウス筋芽細胞 C2C12 細胞 (理化学研究所細胞バンクより入手) ならびにマウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞 (理化学研究所細胞バンクより入手) を、10%ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) を加えた α -MEM 培地 (Sigma 社) にて 5%CO₂, 95%Air の条件下にて直径 100mm の細胞培養用プラスチック dish (falcon 社) で培養を行った。

【歯根膜細胞株の樹立】

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%CO₂, 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. これらの細胞より, Isogen を用い total RNA を抽出した. Total RNA の 1ug を逆転写酵素 (reverse transcriptase, Qiagen) を用いて cDNA を合成した. これらの cDNA を鋳型として, 種々の mRNA の塩基配列から設計した 2 種類の各種オリゴヌクレオチドプライマーを使用し PCR 法を行なった. PCR 産物を 2%アガロースゲルにて電気泳動し, 紫外線照射下でデジタルカメラにて撮影し, 種々の遺伝子の発現を調べた.

【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、0.125%トリプシン, 0.5%EDTA 溶液 (Sigma 社) を用い dish より剥離させ, 1X10⁴/ml ならびに 1X10⁵/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. カーボンナノチューブ/ファイバーは原液として 10 ppm の濃度のものを用いた.

【細胞増殖活性の測定】

48 時間後, DNA 合成量について BrdU を用いた ELISA 法 (Cell Proliferation ELISA System,

Amasham Bioscience Co.) 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。

この方法では、培養細胞に 10 μ M の BrdU 40 μ l を加え 2 時間培養し、BrdU の取り込みを行った。BrdU 標識試薬を除去後、細胞固定化剤を加えてインキュベーションし細胞を固定させた。その後、固定化剤を除去し、ブロッキング剤を加えブロッキング処理を行った。ブロッキング後、Peroxidase 標識 BrdU 抗体を加えた。Tetramethylbenzidine を基質として Peroxidase 酵素反応を行い、450nm の吸光度を分光光度計で測定した。

MTT 法は MTT3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide が細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素の基質であり、生存能の高い細胞ほど還元される MTT 量が多く、その結果生じるホルマゼン量が生存細胞数とよく対応するため生細胞のみを測定する方法として用いられている。本研究においては、MTT 溶液 (5 μ g/ml) を各ウェルに 40 μ l ずつ添加し、分光光度計を用いて 570nm の吸光度測定を行い、その吸光度を用い評価を行った。

【アルカリフォスファターゼ活性の測定】

細胞の機能に対する影響について、骨芽細胞の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活性を、活性染色法を用いて測定した。活性染色法は bromo chloro indolylphosphate (BCIP) ならびに nitroblue tetrazolium (NBT) を使用した。すべての実験は独立した実験として複数回行い、それらの結果を t 検定を用いた統計処理を行い解析した。

C. 研究結果

acid_cut_NL2_MW, ET_ozon_cut_NL2_MW のナノチューブもしくは acid_cut_ナノファイバーを、C2C12 細胞に添加し培養し、BrdU の取り込みを指標とした DNA 合成量 (Fig. 1) ならびに MTT 法 (Fig. 2) を用いて測定した

生細胞数を、無添加のコントロールと比較した。DNA 合成量と生細胞数の両者ともに有意な変化 ($p < 0.01$) を示すものはなかった。すなわち、acid_cut_NL2_MW, ET_ozon_cut_NL2_MW もしくは acid_cut_CNF は、C2C12 細胞における細胞増殖活性に対し、添加した濃度においては何ら変化を与えなかった。

サイズ制御した NL2_MW を C2C12 細胞に添加し培養したところ、ac_size_670nm_NL2_MW では BrdU の取り込みを指標とした DNA 合成量 (Fig. 1) と MTT 法によって測定した生細胞数 (Fig. 2) は、無添加のコントロールと比べて有意な差は認められなかった。一方、ac_size_550nm_NL2_MW もしくは ac_size_220nm_NL2_MW を加えた場合、DNA 合成量と生細胞数は、その濃度依存性との相関がはっきりしないデータもあるが、概して DNA 合成量が増加 ($p < 0.01$) し、生細胞数も増加 ($p < 0.01$) した。また、その増加の程度は、550nm に比べて 220nm では大きな値を示した。

MC3T3-E1 細胞において同様の実験を行った。acid_cut_NL2_MW, ET_ozon_cut_NL2_MW もしくは acid_cut_CNF を、MC3T3-E1 細胞に添加し培養し、BrdU の取り込みを指標とした DNA 合成量 (Fig. 3) ならびに MTT 法 (Fig. 4) を用いて測定した生細胞数を、無添加のコントロールと比較したが、一致した結果は得られず、細胞増殖活性に対する影響は認められなかった。さらに、サイズ制御した NL2_MW を MC3T3-E1 細胞に添加し培養したが、いずれのサイズの MW でも、細胞増殖活性に影響を与えなかった (Figs. 3 and 4)。

雄 28 ヶ月齢クラウン系医用ミニプタより下顎前臼歯を抜去し、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 (Fig. 5)。この細胞を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。TeSPDL-11, 12 細胞を位相差顕微鏡で観察した (Fig. 6, 7) と ころ, いずれの細胞も繊維状の線維芽細胞に 近い形態が観察されたが, その形態は異なっ ていた。RT-PCR 法を用い mRNA 発現を検討 したところ TeSPDL-11 細胞は TeSPDL-12 細胞 と比較してアルカリフォスファターゼ(ALP) ならびに Runx-2 mRNA がいずれも強く発現 していた。

TeSPDL-3, 11 ならびに 12 細胞に 3 種類の サイズの多層カーボンナノチューブもしくは 3 種類の acid_cut ナノファイバーを種々の濃 度で添加し BrdU の取り込みを指標とした DNA 合成量を検討した (Fig. 8, 9, 10) .

TeSPDL-3 細胞においては, 5 μ l の ac_size_ 550nm_NL2_MW を添加した場合 DNA 合成量 の増加が見られた。また, 25 μ l の PC_2 μ m_ cake_CNFs_040207a および 25 μ l の PC_0.4 μ m_cake_CNFs_040207b の添加によって DNA 合成量は低下した。しかしながら他の多層カ ーボンナノチューブもしくは acid_cut ナノフ ァイバーを添加しても DNA 合成量に変化は 認められなかった (Fig. 8) .

TeSPDL-11 細胞においては, 10 μ l の PC_ 2 μ m_cake_CNFs_040207a の添加により DNA 合成量が減少した (Fig. 9) が, TeSPDL-12 細 胞においては変化が見られなかった (Fig. 10) . 10 μ l , 25 μ l の ac_size_825nm_NL2_MW_ 031126a, 25 μ l の PC_0.1 μ m_cake_CNFs_ 040207c の添加によって TeSPDL-12 細胞では DNA 合成量が低下したが, TeSPDL-11 細胞に おいては変化が見られなかった。

ALP 活性染色では, TeSPDL-3 細胞はその活性が 高い細胞であるが 3 種類のサイズの多層カーボン ナノチューブもしくは 3 種類の acid_cut ナノフ ァイバーの添加により濃度依存的な ALP 活性の低下 が見られた (Fig. 11) . しかしながら, TeSPDL-11 および 12 細胞においては 3 種類のサイズの多層 カーボンナノチ

ューブもしくは 3 種類の acid_cut ナノファイ バーの添加による ALP 活性の変化は認めら れなかった (Fig. 12, 13) .

D. 考察

炭素分子のみからなり, 極性を有さない分 子であるカーボンナノチューブはもともと分 子構造上は Bio inactive な性質を有すると考え られてきた。本研究で用いたサイズ制御した あるサイズのカーボンナノチューブならびに ファイバー分子は, 何らかのメカニズムを介 して, 細胞の増殖活性ならびに ALP 活性に対 して影響を与えることが考えられた。

本研究で使用した 3 種類の細胞 TeSPDL-3, 11 ならびに 12 細胞では, 形態ならびに mRNA 発現に違いが見られたことから, 異なる形質 を有していることと考えられる。それぞれの 細胞に対するカーボンナノチューブならびに ファイバー分子の細胞増殖活性ならびに ALP 活性に違いがみられたことから, ナノ粒子の 細胞に対する作用には細胞特異性があること が考えられた。C2C12 細胞と MC3T3-E1 細胞 の細胞増殖活性に対するカーボンナノチュー ブならびにファイバー分子の作用が異なるこ とからも, この細胞の種類による作用特異的 があることが考えられた。

これらの作用が一体どのような作用メカニ ズムによるものかは今後の研究課題である。 本研究で使用したカーボンナノファイバーは 可溶化処理をしており, 水懸濁状態であり, 細胞表面の何らかの受容体の構造変化を介し て, その細胞内シグナル伝達機構を活性化し うる可能性がまず考えられた。

また, サイズ制御された微細な粒子の細胞 そのものに対する物理的刺激性である。物理 的な刺激を細胞がどのように受容するのかそ の機序は明らかではないが, その受容機構の 細胞特異性が, 本研究で見られた細胞間にお ける反応性の違いをもたらした可能性が考え られた。

さらに、微粒子のエンドサイトーシスによる可能性が挙げられる。一般に細胞は大きさの小さい不溶性分子を非自己すなわち異物として認識し、それらの分子を細胞の異物認識機構によりエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれることが知られている。エンドサイトーシスには、受容体を介する receptor-mediated の機構と受容体を介さない receptor-independent の2つの機構がある。一般的にスカベンジャーとして異物処理を担い貧食作用を有するマクロファージ等では、その作用の阻害剤として cytocharasin B が用いられている。マウス腹腔マクロファージにポリエチレン粒子を貧食させると、マクロファージ活性化が報告されるとの報告もある。積極的な貧食作用を有するマクロファージと本研究で用いた歯根膜細胞とは、異物処理といった機能は異なるものと考えられる。本研究で用いたナノファイバー・チューブが、細胞でエンドサイトーシスされるのか、それは細胞特異性が存在するか、またそれによって細胞に対する機能に何らかの影響を及ぼし得るかといった問題に対して、現在さらに詳細な機構に関し研究を進行中である。

E. 結論

医用ミニプタ歯根膜組織から分離した細胞をヒト telomerase 遺伝子の導入により不死化した異なる形質を有する培養細胞株 (TesPDL cell) を確立した。これら3つのミニプタ由来歯根膜細胞株 TesPDL-3, 11, 12, 筋芽細胞および骨芽細胞を用い、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た。細胞増殖活性ならびにアルカリフォスファターゼ活性は、細胞によってカーボンナノチューブならびにファイバーのサイズならびに添加量により異なっていた。これらの結果から、カーボンナノチューブ・ファイバーの細胞に対する作用

には細胞特異性があることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 学会発表

田村正人, 骨の細胞の分化と機能, 「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」平成14年度第1回目標策定研究発表会, 平成14年9月9日, 北海道赤井川村

田村正人, 田路和幸, 古月文志, 鈴木豊典, 戸塚靖則, 可溶化ナノロッドの骨芽細胞培養系における作用 「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」平成14年度第2回研究発表会, 平成15年2月17日, 岐阜

田村正人, 田路和幸, 古月文志, 鈴木豊典, 戸塚靖則

多層カーボンナノチューブの骨芽細胞ならびに筋芽培養系における作用

「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」

第3回研究発表会, 松島(宮城)平成15年9月9日

衣斐美歩, 秋本結輝, 佐藤義倫, 田路和幸, 川崎貴生, 田村正人

カーボンナノチューブの骨芽細胞ならびに筋芽細胞培養系における細胞増殖活性と細胞機能に及ぼす影響

「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」

第4回研究発表会, 登別(北海道)平成16年2月20日

山本松男，張桂霞，中島愛子，和泉雄一，高尾尊身，飯田順一郎，横山敦郎，田村正人
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

「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」

第5回研究成果発表会，仙台・秋保（宮城）

2004年9月15日

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

「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」

第6回研究成果発表会，岐阜・下呂（岐阜），

2005年2月15日

衣斐美歩，和田悟史，佐藤義倫，田路和幸，

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

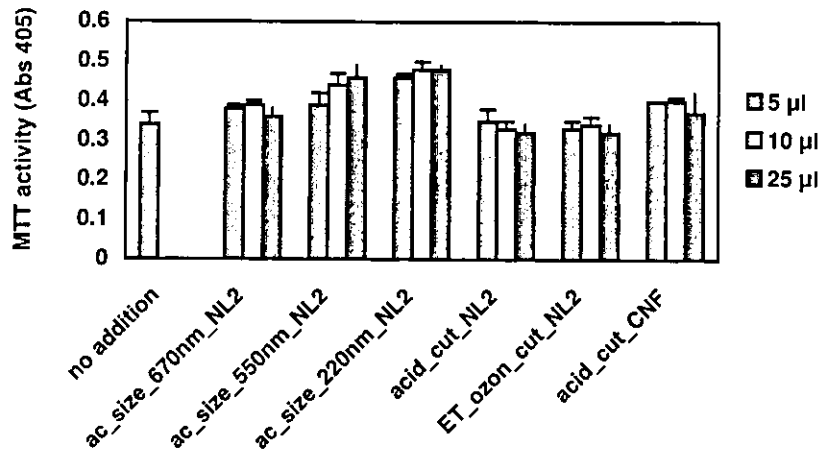


Fig. 1. Effects of carbon NL or NF on cell viabilities in C2C12 cells on culture

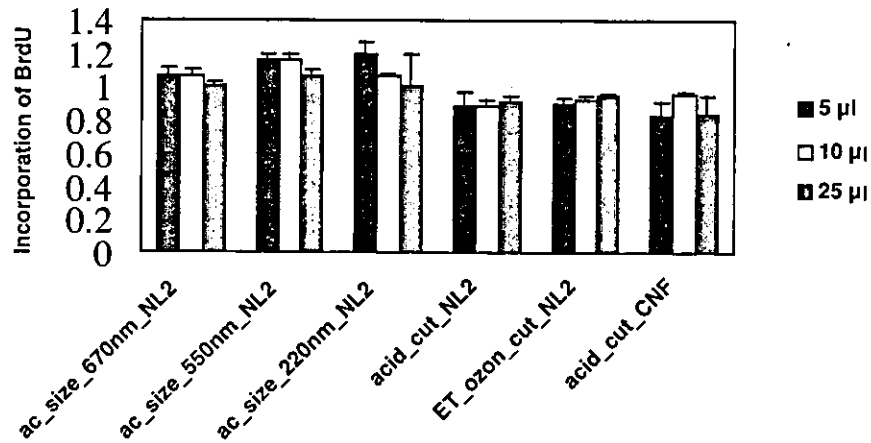


Fig. 2. Effects of carbon NL or NF on DNA synthesis in C2C12 cells on culture

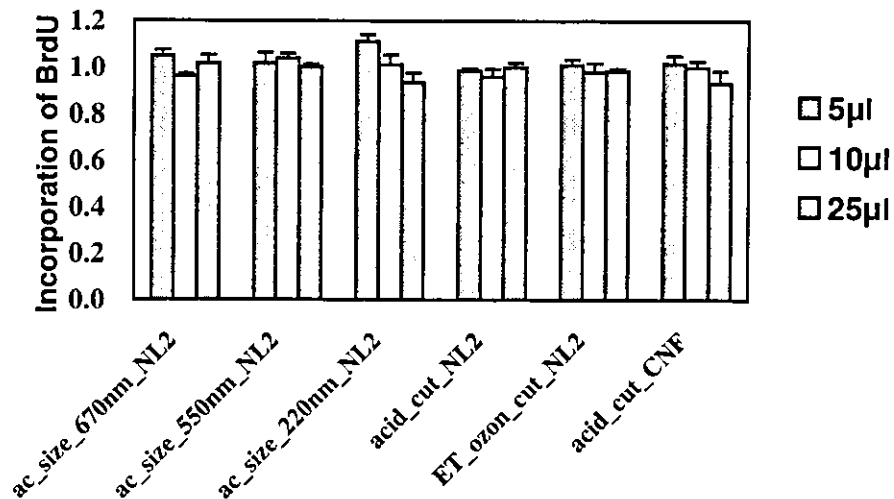


Fig. 3. Effects of carbon NL or NF on DNA synthesis in MC3T3-E1 cells on culture

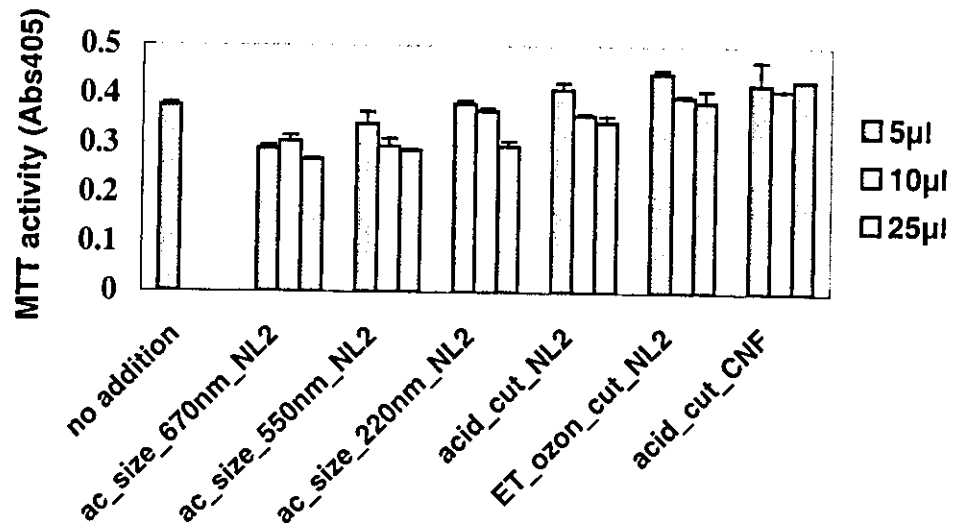


Fig. 4. Effects of carbon NL or NF on cell viabilities in MC3T3-E1 cells on cultur

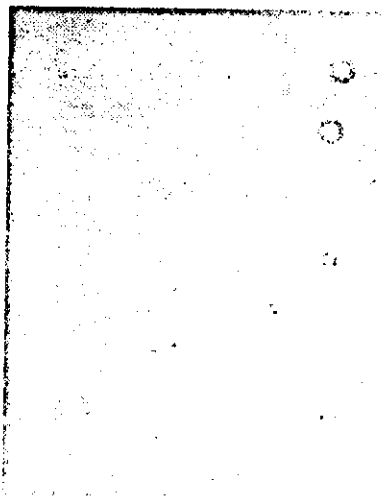


Fig. 5 歯根膜組織片からの細胞の out growth

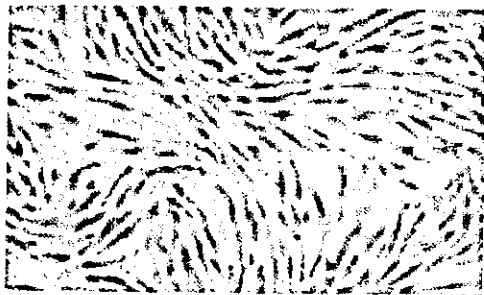


Fig. 6 TesPDL11 細胞



Fig. 7 TesPDL12 細胞

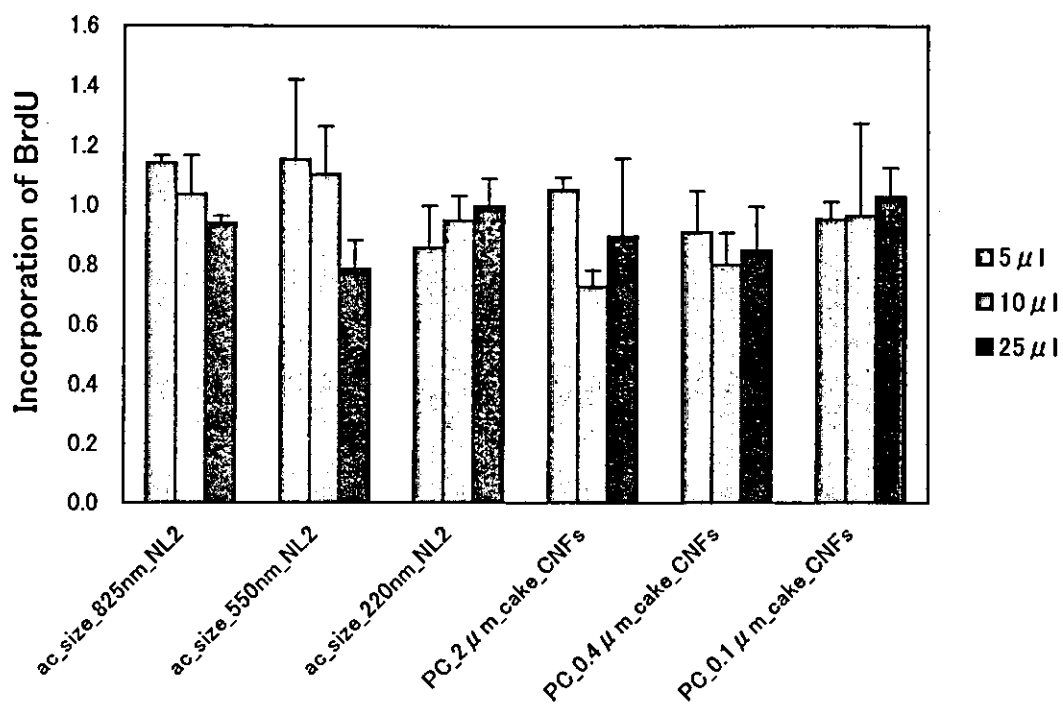


Fig. 8 Effects of carbon NT or NF on DNA synthesis in TeSPDL-3 cells

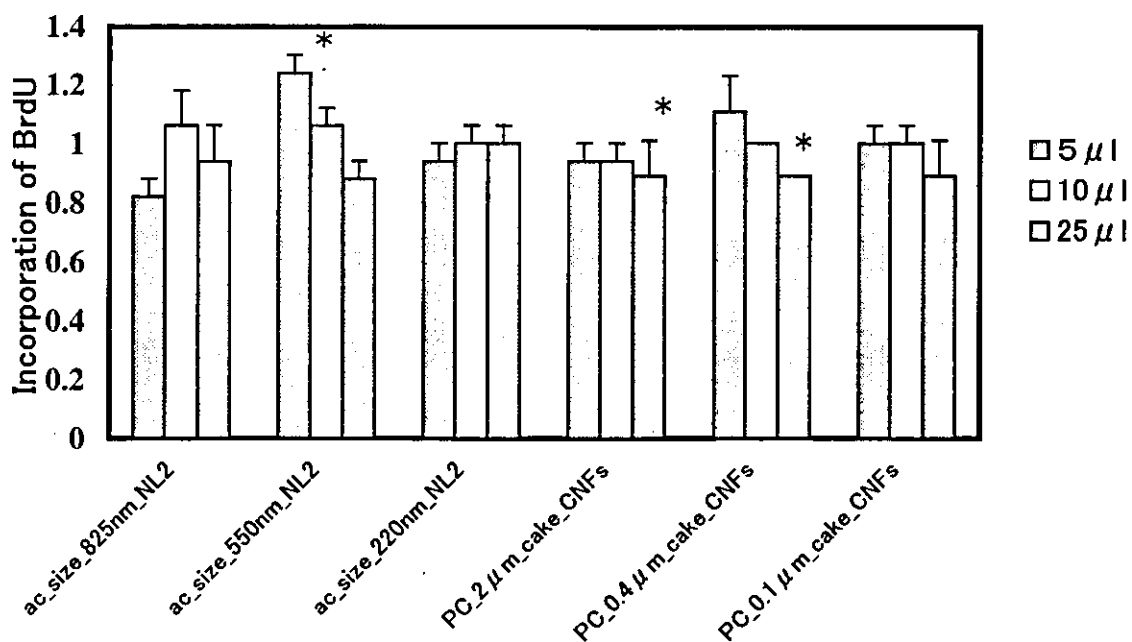


Fig. 9 Effects of carbon NT or NF on DNA synthesis in TesPDL-11 cells

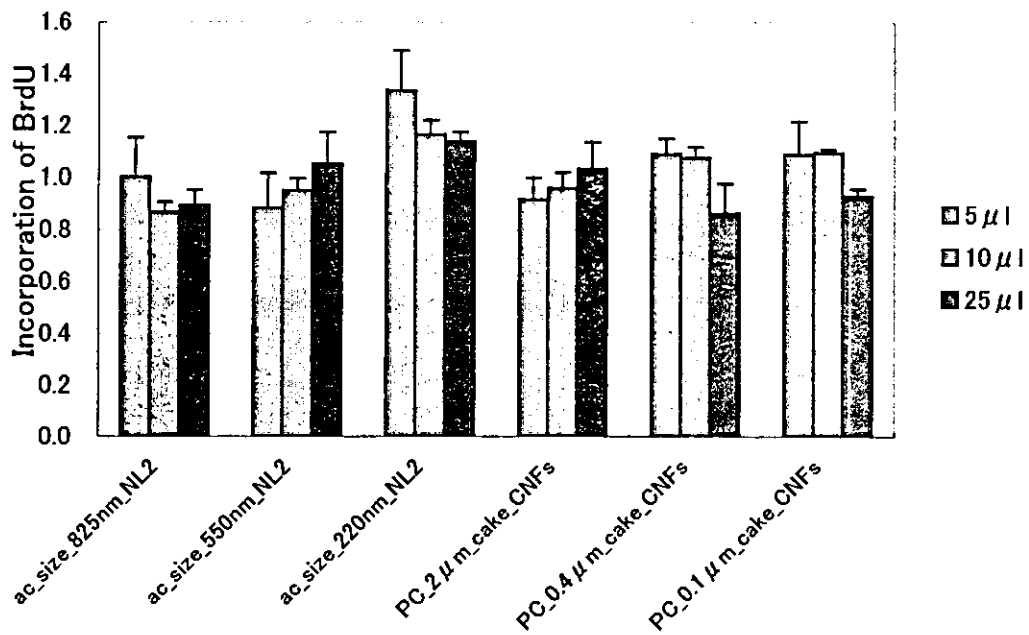


Fig. 10 Effects of carbon NT or NF on DNA synthesis in TesPDL-12 cells

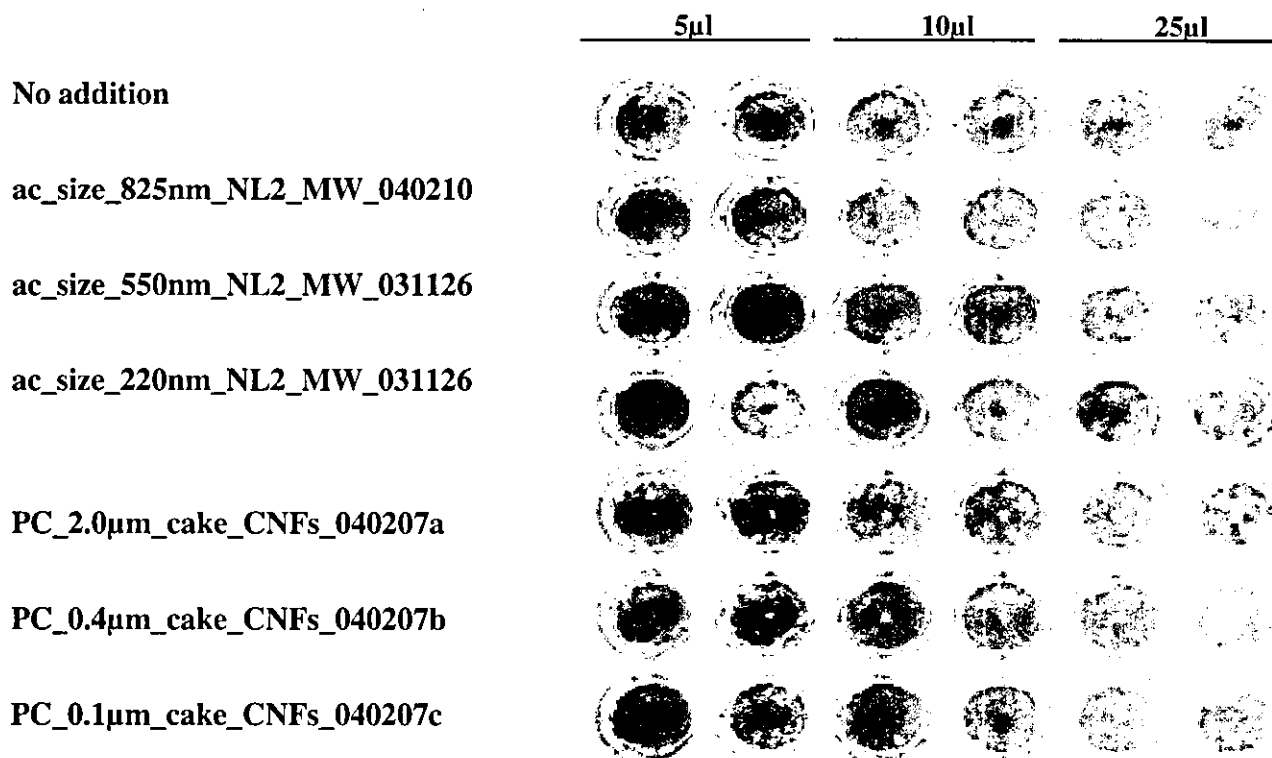


Fig. 11 Effects of carbon NT or NF on alkaline phosphatase (ALP) activities TeSPDL-3 cells

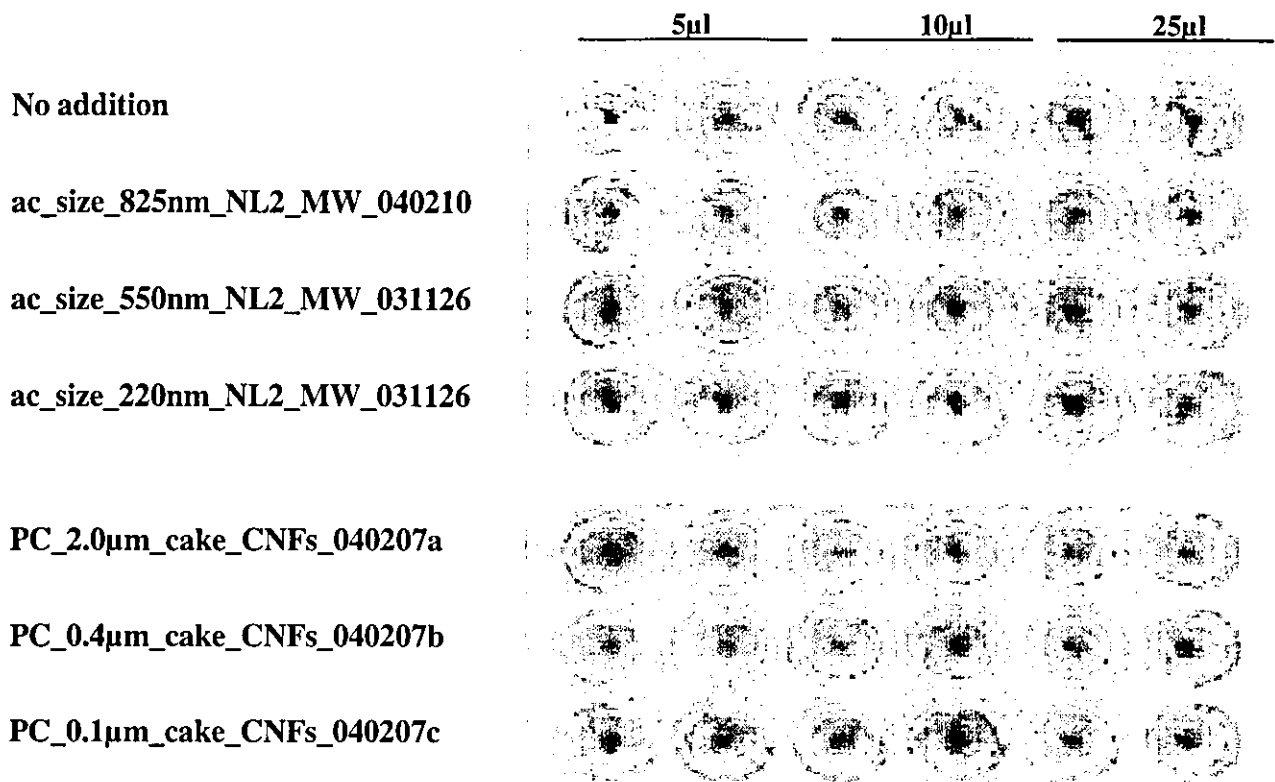


Fig. 12 Effects of carbon NT or NF on alkaline phosphatase (ALP) activities TeSPDL-11 cells

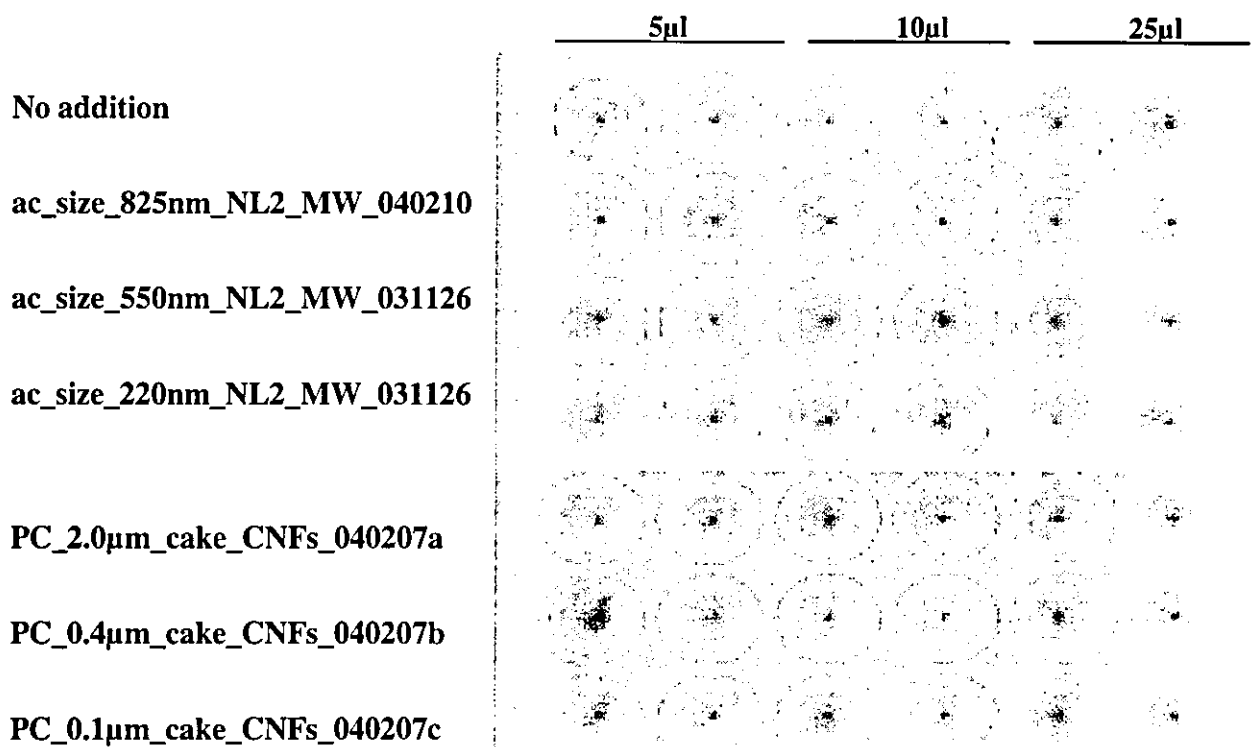


Fig. 13 Effects of carbon NT or NF on alkaline phosphatase (ALP) activities TeSPDL-12 cells

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

主任研究者	亙理 文夫	北海道大学大学院歯学研究科	教授
研究協力者	渋谷 真希子	北海道大学大学院歯学研究科	大学院生
研究協力者	木村 邦衛	北海道大学大学院歯学研究科	大学院生
研究協力者	平沖 敏文	北海道大学大学院歯学研究科	助教授
研究協力者	野田坂 佳伸	北海道大学大学院歯学研究科	助手
研究協力者	宇尾 基弘	北海道大学大学院歯学研究科	助教授
研究協力者	福島 和昭	北海道大学大学院歯学研究科	教授
研究協力者	鈴木 邦明	北海道大学大学院歯学研究科	教授

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に、CNTあるいはCNFと2種類のスピラベル剤をそれぞれ組み込んだリポソームを作成し、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを測定することによってリポソームの物性に対するCNTおよびCNFの作用を評価すると同時に、粒度分布測定装置、あるいは電子顕微鏡を用いてリポソーム、CNTおよびCNFの大きさを測定し形状を観察した。電子顕微鏡写真で観察された単独のCNTおよびCNFの長さはいずれも1~2 μm 程度であった。CNTあるいはCNFを添加したESRスペクトルの線形や計算されるパラメーター値は非添加群と顕著な差はなく、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無いことが示された。

A. 研究目的

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ラベルし、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。

B. 研究方法

リポソームを形成するリン脂質には、4種類のホスファチジルコリン (PC)、すなわち飽和脂肪酸としてジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) およびジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、不飽和脂肪酸としてジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、そして両者の混合する脂肪酸として卵黄由来のホスファチジルコリン (EYPC) を用いた。リポソームは3種

類作成した。すなわち、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、5-DSA あるいは 16-DSA を組み込んだ小さな 1 枚膜リポソーム (SUV)、さらに、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。以下にその作成法を述べる。

(i) MLV の作成

PC をクロロホルムに溶解し、最終濃度が 500 μ M となるように 5-DSA または 16-DSA を加えた。次に DPPC では 55°C、他の PC では 37°C の保温下で回転式エバポレーターにて、次いでデシケーターに 2 時間以上保管して完全に溶媒を除去した。作成した脂質フィルムに CNT あるいは CNF を添加しない場合は 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を、CNT あるいは CNF を添加する場合は蒸留水と CNT あるいは CNF を加えてボルテックスミキサーにてよく攪拌し、PC の最終濃度が 10 mg/ml の白濁した MLV 懸濁液を得た。その際、 T_c より 10°C 以上高い液温で攪拌するために、DMPC では 37°C、DPPC では 55°C で、他は室温で操作を行った。

(ii) SUV の作成

DPPC を用いて MLV を作成した後、55°C で 30 分間、プローブ型ソニケーターにて溶液が透明になるまで超音波処理した。その後、3000 rpm にて遠心分離操作を行い、ソニケーターのプローブから溶出したチタニウムを沈殿させて SUV 懸濁液を得た。SUV は DPPC のみで作成した。

(iii) LUV の作成

MLV を作成する際に作成した脂質フィルムに、蒸留水と最終濃度が 24 mM となるようにコール酸を加えてボルテックスミキサーにてよく攪拌し、CNT を各々添加した。その後、それぞれの溶液を 2 日間透析しコール酸を除去し、PC の最終濃度が 10 mg/ml の大きな 1 枚膜リポソーム (LUV) 懸濁液を得た。その際、PC の相転移温度 T_c より 10°C 以上高い液温で攪拌するために室温で操作を行った。

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。

得られた標本 50 μ l をマイクロシリンジにて取り出しガラス製キャピラリー (外径 1.52 mm、内径 1.09 mm、長さ約 8.5 cm) に注入し、揮発を防ぐためワックスとパラフィルムによる栓をして ESR スペクトルの測定した。測定は、日本電子製 FEIX を用い、X band, 9.2 GHz にて行った。温度変化を測定する際の温度は 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45 および 50 °C で行い、その他は 22°C にて測定した。スペクトルの分離幅 A_{max} および A_{min} , 3 本のシグナルの強度 $h(1), h(0), h(-1)$, 中央のシグナルの線幅 ΔH を Fig. 1 に示したように求めた。マイクロ波の出力は 1 mW とし、その他の測定条件は以下の様に設定した。

scan width : 330 \pm 5 mT, sweep time : 4 min, modulation frequency : 100 kHz, modulation width : 0.08 - 0.20 mT, amplitude : 2 \times 100, response : 0.1 sec

また、S/N 比を上げるために、最大 4 回まで積算を行った。

測定された ESR スペクトルをもとにオーダーパラメーター (S) と回転相関時間 (τ) を計算した。S はニトロキシドラジカルを含むスピラベル剤がどのように配向し、異方的回転を行っているのかを示すものであり、膜構造をとる物質にスピラベル剤をラベルした場合、S は物理的性質のひとつである膜の流動性を示す指標として用いられている。S は 0 から 1 の間の値をとり、完全に等方的な運動をしている場合は S=0、完全に一方向にのみ向いている場合は S=1 となる。S は得られたスペクトルの分離幅 A_{max} および A_{min} (Fig. 1) を用い、以下の式を用いて計算した。

$$S = (A_{//} - A_{\perp}) / [A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2] k$$

ここで、 $A_{//}$, A_{\perp} , k は以下のように規定した。

$$A_{//} = A_{max}$$

$$A_{\perp} = A_{min} + 1.4 (1 - S_{app}), \quad S_{app} = (A_{max} - A_{min}) / [A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2]$$

$$k = a_0 / a'_{0}, \quad a_0 = (A_{//} + 2 A_{\perp}) / 3, \quad a'_{0} = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) / 3$$

また、 A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} はスピラベル剤のテンソル値であり、5-DSA については、Koga らが使用した値 ($A_{xx} = 0.63$ mT, $A_{yy} = 0.58$ mT, $A_{zz} = 3.16$

mT) を用いた。また、16-DSA のテンソル値は文献上で見あたらないため、5-DSA のテンソル値を用いた。

スピンラベル剤の回転運動の速さを示す τ は 3 本のスペクトルの強度 $k(1)$ 、 $k(0)$ 、 $k(-1)$ 、中央シグナルの線幅 ΔH の値 (Fig. 1) を以下の式に用いて計算した。

$$\tau = 341.8 \times 10^{-12} \times \Delta H \left\{ \sqrt{h(0)/h(-1)} - \sqrt{h(0)/h(1)} \right\}$$

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。

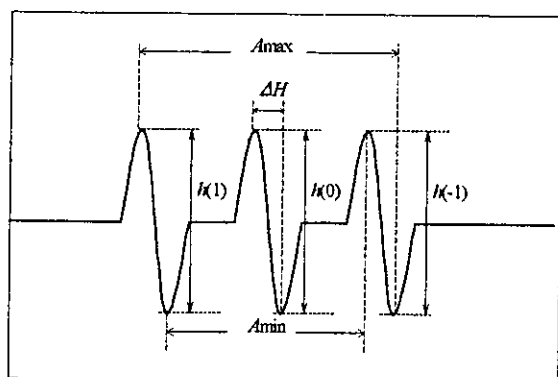


Fig.1 スピンラベル剤より得られる典型的な ESR スペクトル

C. 研究結果

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. 2)。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 ozone-cut NL2 いずれも 1 ~ 2 μm 程度であった (Figs. 3-6)。

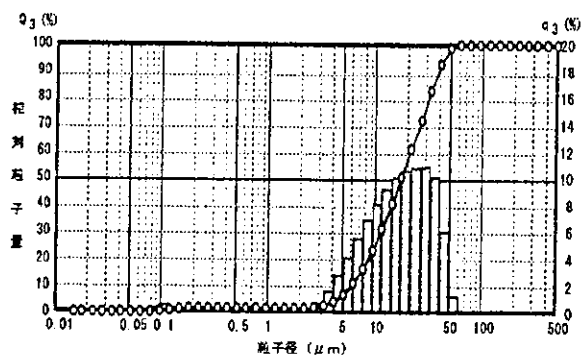


Fig. 2 粒度分布測定 (MLV)



Fig. 3 acid_cut_NL2_MW_031003

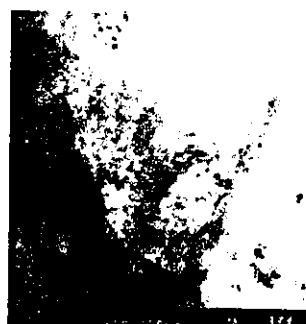


Fig. 4 ET_ozon_cut_NL2_MW_031003



Fig. 5 acid_cut_CNF_031003



Fig. 6 acid_cut_CNF_031003

2) 5-DSA、16-DSA のいずれを組み込んだ MLV のスペクトルも 3 本のシグナルが示されたが、その線形は異なり、16-DSA を組み込んだ標本のスペクトルは 5-DSA に比べ比較的鋭いシャープな 3 本のシグナルを示した (Fig. 7)。SUV や LUV においてもほぼ同様のスペクトルが示された。また、温度を上昇させたところ、ESR スペクトルの幅は狭まり、スペクトル強度は増加した (Fig. 8)。S、 τ についてみると、飽和脂肪酸 (DMPC、DPPC) においては相転移温度付近で S、 τ ともに急減したが、不飽和脂肪酸 (DOPC) と EYPC においては測定した温度範囲では大きな変化がみられなかった (Fig. 9, 10)。

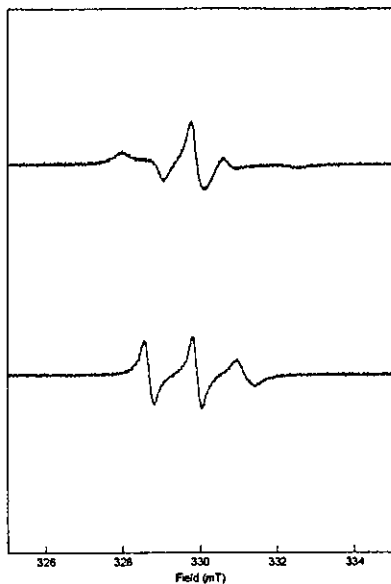


Fig. 7 EYPC (MLV)に組み込んだ 5-DSA と 16-DSA の ESR スペクトル(上から 5-DSA、16-DSA)

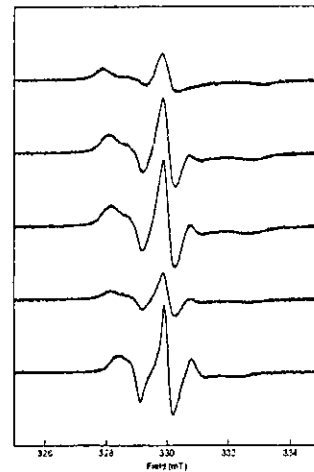


Fig. 8 5-DSA/DPPC の ESR スペクトル (上から 15°C、37°C、40°C (以上 modulation width 0.2 mT)、40°C、50°C (以上 modulation width 0.08 mT))

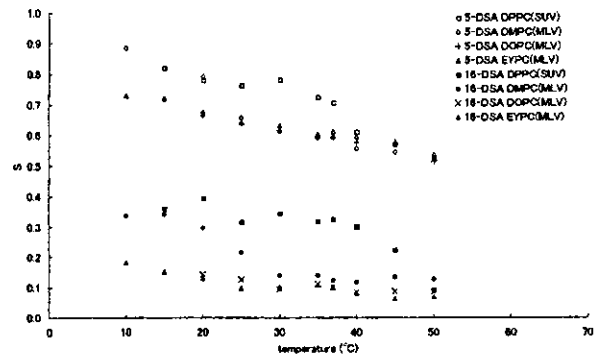


Fig. 9 5-DSA および 16-DSA を組み込んだの S の温度依存性 (□ : 5-DSA DPPC (SUV), ○ : 5-DSA DMPC (MLV), + : 5-DSA DOPC (MLV), △ : 5-DSA EYPC (MLV), ■ : 16-DSA DPPC (SUV), ● : 16-DSA DMPC (MLV), × : 16-DSA DOPC (MLV), ▲ : 16-DSA EYPC (MLV))

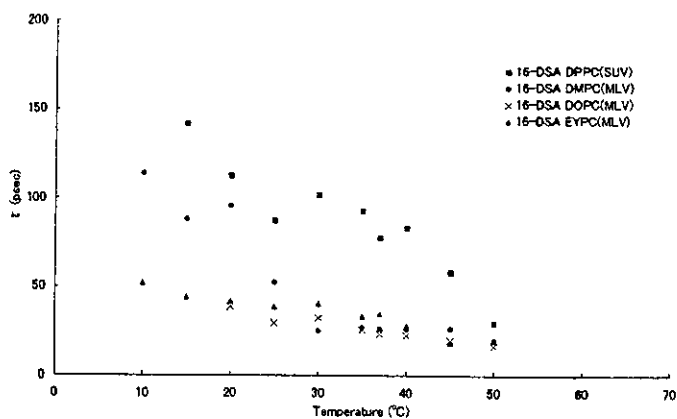


Fig. 10 16-DSA の τ の温度依存性 (■: 16-DSA DPPC (SUV), ●: 16-DSA DMPC (MLV), ×: 16-DSA DOPC (MLV), ▲: 16-DSA EYPC (MLV))

3) 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. 11, 12)。そのスペクトルから計算された S および τ においても非添加のものとはほとんど差がなかった (Table 1)。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. 13)。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。

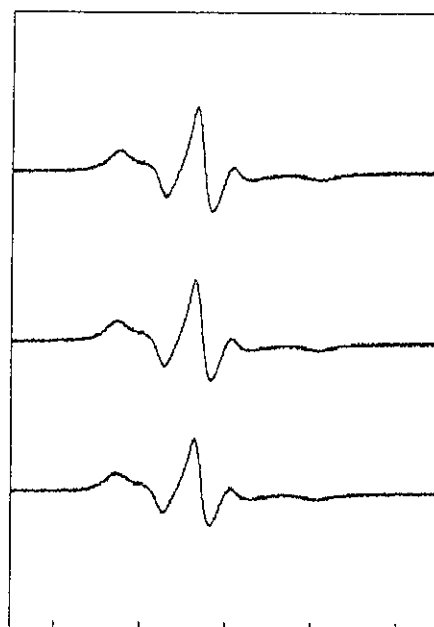


Fig. 11 EYPC (MLV) に組み込まれた 5-DSA の ESR スペクトル (上から control, acid cut NL2, ET ozon cut NL2, acid cut CNF)

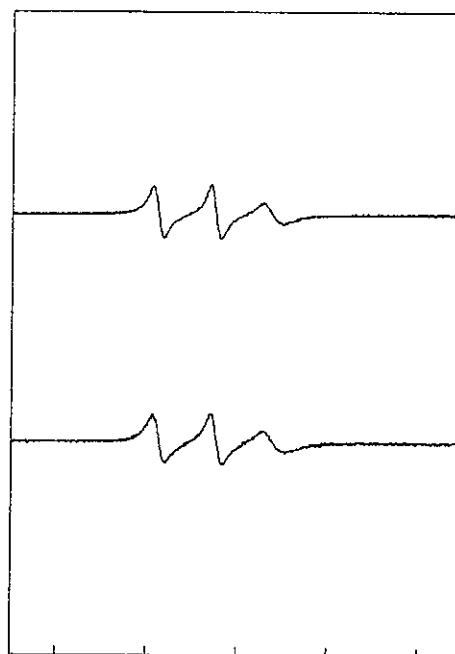


Fig. 12 EYPC (MLV) に組み込まれた 16-DSA の ESR スペクトル (上から acid cut CNF 0.1 mg/ml, acid cut CNF 0.2 mg/ml)

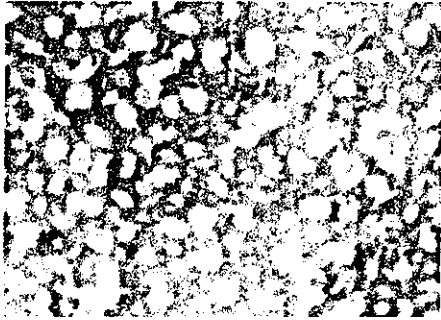


Fig. 13 多重層リポソーム (MLV)

4) 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. 14)。CNTを添加したLUV懸濁液のESRスペクトルも非添加のものとはほとんど差がなく (Fig. 15)、そのスペクトルから計算した S および τ も非添加のものとは比べて顕著な差は認められなかった (Table 1)。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. 16)、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。

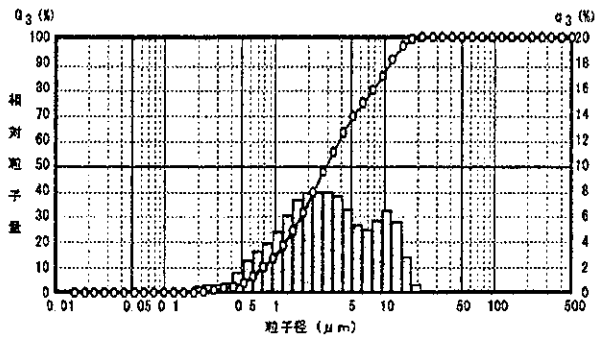


Fig. 14 粒度分布測定 (LUV)

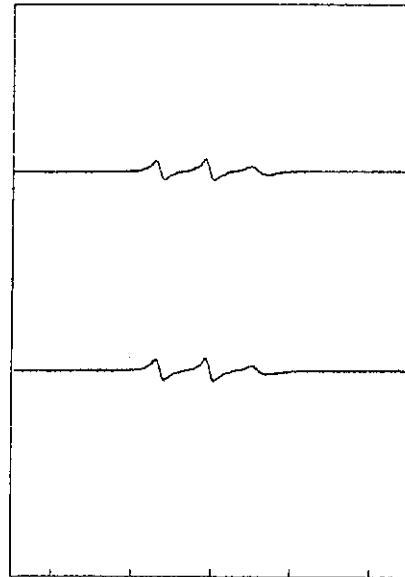


Fig. 15 EYPC (LUV) に組み込まれた16-DSAのESRスペクトル (上から acid cut NL2, ET ozon cut)

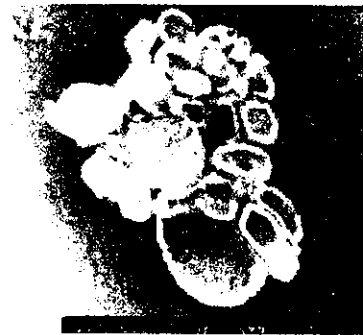


Fig. 16 大きな1枚膜リポソーム (LUV)