

Sample	S	$\tau$ (psec)
5-DSA+PC コントロール	0.68	
5-DSA+PC+acid cut NL2 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 $\mu$ g/ml	0.12	36
16-DSA+LUV+ET ozon cut NL2 0.1 $\mu$ g/ml	0.11	37

Table.1 測定した ESR スペクトルの S および  $\tau$

5) リポソームを用いた ESR 測定中に、高濃度の 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。

#### D. 考察

5-DSA を組み込んだ多重層リポソームの ESR スペクトルは、16-DSA を組み込んだスペクトルに比べラジカルの運動に異方性があり、回転運動の速さが遅いことを示した。また、5-DSA および 16-DSA を組み込んだ際の ESR スペクトルの S は両者で大きく異なり、両ラベル剤のラジカルは二重膜の異なる部分、すなわち 5-DSA のラジカルは膜の比較的表層に、16-DSA では深層に位置することを示した。さらに、単層リポソームでの S と  $\tau$  をみると、多重層におけるパラメーター

値との違いはほとんどないことから、これらのスピ  
ンラベル剤を含み、ナノチューブを含まないリポ  
ソームにおいて、その実験結果は膜の形態により  
変化しないことが示された。

標本の温度を変化させると、温度の上昇に伴っ  
て ESR スペクトルの幅が狭まり、スペクトル強度  
は増加したことから、温度が上昇するにつれてラ  
ジカルの運動性が高くなることが示された。DMPC、  
DOPC、EYPC の MLV および DPPC から成る SUV の膜  
において、特定の温度領域での流動性に違いがみ  
られたが、これは PC の種類により相転移温度が異  
なるためと考えられた。

CNT および CNF を添加した MLV 懸濁液と LUV  
懸濁液の 5-DSA および 16-DSA における ESR スペ  
クトルの線形変化や、スペクトルから計算され  
た S および  $\tau$  の値が非添加のものに比べ顕著な  
差がなかったことから、今回の条件下では 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。

高濃度の CNF を添加したサンプルで相分離が  
生じた原因として、ESR 測定時のマイクロ波の  
電場成分が電導体である CNF に影響を与えた可  
能性があると推定しているが、さらに検討を加  
えたい。

#### E. 結論

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  
その効果を調べる必要があるとあり、今後、種  
々条件を変えたりリポソームを作成して CNT 有  
りあるいは 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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 渋谷真希子, 鈴木邦明, 平沖敏文, 木村邦衛,  
堤 耀廣, 福島和昭, スピンラベル剤の ESR スペク

トルに対する全身麻酔薬の影響, 北海道歯学会雑誌, 24 巻 2 号, 135-143, 2003

2) 渋谷真希子, 平沖敏文, 木村邦衛, 堤 耀廣, 鈴木邦明, 福島和昭, リポソーム中に存在するスピ  
ンラベル剤の ESR スペクトルと全身麻酔薬の影響,  
北海道歯学会雑誌, 25 巻 1 号, 68-76, 2004

3) 木村邦衛, 平沖敏文, 渋谷真希子, 福島和昭,  
鈴木邦明, リポソーム中のスピラベル剤の周辺環  
境に及ぼす吸入麻酔薬の影響とその温度依存性, 北  
海道歯学会雑誌, 25 巻 2 号, 346-355, 2004

4) 木村邦衛, 平沖敏文, 渋谷真希子, 福島和昭,  
鈴木邦明, リポソーム中のスピラベル剤の周辺環  
境に及ぼすホスファチジルコリンの種類と温度の影  
響, 北海道歯学会雑誌, 25 巻 2 号, 356-367, 2004

## 2. 学会発表

1) ○木村邦衛, 渋谷真希子, 平沖敏文, 野田坂佳  
伸, 古月文志, 宇尾基弘, 赤坂 司, 佐藤義倫, 田  
路和幸, 福島和昭, 亘理文夫, 鈴木邦明: 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, 平成 16 年冬期第 6 回研究成果発表会(岐阜,  
2005 年 2 月). (抄) 同講演予稿集, 75-79, 2005

2) ○渋谷真希子, 鈴木邦明, 木村邦衛, 平沖敏文,  
福島和昭: スピラベル剤の ESR スペクトルに対す  
る全身麻酔薬の影響, 第 31 回日本歯科麻酔学会総会  
(岡山, 2003 年 9 月). (抄) 日本歯科麻酔学会雜  
誌, 31 巻 4 号, 68, 2003

3) ○渋谷真希子, 鈴木邦明, 木村邦衛, 平沖敏文,  
福島和昭: 脂質様スピラベル剤の ESR スペクトル  
と全身麻酔薬がおよぼす影響, 第 84 回北海道医学大  
会(札幌, 2004 年 9 月). (抄) 同講演予稿集, 22,  
2005.

4) ○木村邦衛, 平沖敏文, 渋谷真希子, 鈴木邦明,  
福島和昭: リン脂質二重膜に対する吸入麻酔薬の作  
用の温度依存性- 電子スピン共鳴 (ESR) を用いた研  
究-, 第 32 回日本歯科麻酔学会総会(東京, 2004  
年 10 月). (抄) 日本歯科麻酔学会雑誌, 32 巻 4  
号: 564 (2004).

5) ○渋谷真希子, 鈴木邦明, 木村邦衛, 平沖敏文,  
福島和昭: リポソーム中に存在するスピラベル剤  
の ESR スペクトルと全身麻酔薬の影響, 第 32 回日本  
歯科麻酔学会総会(東京, 2004 年 10 月). (抄) 日  
本歯科麻酔学会雑誌, 32 巻 4 号: 564 (2004).

6) ○渋谷真希子, 鈴木邦明, 平沖敏文, 木村邦衛,  
堤 耀廣, 福島和昭: 全身麻酔薬がたんぱく質およ  
び脂質に及ぼす影響の電子スピン共鳴法による解析,  
第 20 回日本歯科医学会総会(神奈川, 2004 年 10 月).  
(抄) 日本歯科医師会雑誌, 57 巻 4 号, 394, 2004

7) ○渋谷真希子: 全身麻酔薬がモデル生体膜にお  
よぼす影響の電子スピン共鳴法による解析, 平成 16  
年度北海道歯学会秋季学術大会(札幌, 2004 年 11  
月) (抄) 北海道歯学会雑誌, 25 巻 2 号, 346-355,  
2004

8) 渋谷真希子, 平沖敏文, 木村邦衛, 吉村善隆,  
出山義昭, 福島和昭, ○鈴木邦明: リポソーム中の  
異なった位置にラベルされたスピラベル剤の E S  
R スペクトルに対する全身麻酔薬の影響, 第 7 8 回  
日本薬理学会総会(神奈川, 2005 年 3 月). Journal  
of Pharmacological Sciences, Supplement, 97, 271  
P, 2005

9) 木村邦衛, 平沖敏文, 渋谷真希子, 吉村善隆,  
出山義昭, 福島和昭, ○鈴木邦明: リポソーム中の  
スピラベル剤に及ぼす吸入麻酔薬の影響とその温  
度依存性, 第 7 8 回日本薬理学会総会(神奈川, 2005  
年 3 月). Journal of Pharmacological Sciences,  
Supplement, 97, 271 P, 2005.

分担研究報告書

カーボンナノファイバー/アルギン酸ナトリウムコンポジットコロイド：特性および生体適合性の研究とバイオテクノロジー応用

研究協力者 古月 文志 北海道大学大学院地球環境科学研究科助教授

研究要旨 カーボンナノチューブ (CNT) の分散及び環境メディスンへの応用に関する研究成果を纏めて紹介する。両性イオンミセルを使い、カーボンナノチューブを分散した。分散したカーボンナノチューブの再凝集を防ぐために、高分子ポリマーを添加した。ゲル化、紡糸加工などを処理し、カーボンナノチューブ含有型の複合材料を作成した。汚染物質の捕集、濃縮及び除去の観点から、作成した材料を評価し、新規な環境修復材料としての有用性が立証された。

A. 研究目的

現在、地球上には温暖化やオゾン層の破壊、酸性雨や汚染物質の拡散など多くの環境問題が存在する。これらの問題の解決のためには原因物質の排出を抑制し環境負荷を低減するための科学技術の展開が不可欠であり、省エネやクリーンエネルギー、環境にやさしい商品や新素材の開発など、いわゆるグリーンケミストリーの研究が精力的に行われている。一方で、既に汚染されてしまった環境が地球上には多数存在する。それらを放置すれば汚染は広がるばかりであり、汚染された環境から汚染物質を除去し元の安全な状態に戻すための環境修復法の開発も同時に進められなければならない。環境には汚染物質の他に多くの、そして汚染物質よりもはるかに高濃度の共存物質を含んでいる。これらの中から汚染物質だけを除去することは至難の業である。また、現在多くの汚染物質の処理法が開発されているが、それらの多くは、高濃度の汚染物質を対象としたものであり、低濃度の汚染物質の処理に適用するには非効

率的である。そこで、複雑な環境物質から選択的に汚染物質を捕集し、既存の処理法が適用できる濃度まで濃縮することのできる新規な材料・方法の開発が今求められている。

炭素素材は古くから様々な分野で用いられてきた。木炭は脱臭剤や汚染物質の吸着剤として、黒鉛はその伝導性を生かして各種の電極として、またダイヤモンドはその硬さを利用してカッターや研磨剤として利用されてきた。さらに近年炭素の中にフラーレンやカーボンナノチューブ (CNT)、カーボンファイバー等特殊な構造と機能を有するものが見出され、その特性を最大限使用しうる「場」の探索が盛んに行われている。今回は、バイオ及び環境分野におけるカーボンナノチューブの展開について、特に汚染物質の捕集・除去への利用に関する研究を行った結果について報告する。

B. 研究方法

CNT は、環境中や生体内に侵入・蓄積された有害物質を除去するための新たな吸着剤とな

りうる。ナノカーボン材料を環境の浄化・修復に用いる時、吸着サイトの保護や、汚染物質が吸着したCNTを処理水と分離する際の簡便さのために、CNTを包み込む処理をする必要がある。まず、約1%のカーボンナノチューブを10 mM CHAPSで分散した(図-1)後、1.2% (重量比)のアルギン酸ナトリウムの水溶液にCNTを加え、ホモジナイザーと超音波で十分に混合させる。このアルギン酸ナトリウム/CNTコロイド溶液を図-2に示すカプセル封入装置を用いて、CNT内包型のアルギン酸ビーズに加工する。このシステムはノズルの振動システムと液滴表面への電荷の注入による静電的な反発により、図-3に示すように微小のゲルビーズを安定に作製することができる。

#### C. 研究結果

図-4は陰イオン性の色素であるエオシン-Bを水から除去する実験の結果を示す。CNTを内包したビーズが $0.33 \mu\text{mol}/\text{mg}$ の除去力(吸着容量)を示したことに對して、CNTを内包したビーズ及び活性炭を内包したビーズがそれぞれ $0.06 \mu\text{mol}/\text{mg}$ と $0.19 \mu\text{mol}/\text{mg}$ の値を示した。つまり、吸着剤の除去力はCNT内包ビーズ > 活性炭型内包ビーズ > カーボンナノファイバー内包ビーズの順であった。一方、陽イオン性の化合物(例えば、アクリジンオレンジ)に対する除去力は、CNTを内包したビーズ及びカーボンナノファイバーを内包したビーズはどちらも、活性炭を内包したビーズと比べ高い値を示した。前述の通りCNTの表面構造は、カーボンナノファイバーや活性炭の表面構造と本質的に異なり筒状に丸まったグラフェンシート構造であるため、疎水性の高い化合物、特に本研究で用いたベンゼン環を持った物質と強く結合する性質を持っている。その結果、

対象物質は強い親和力でCNTに保持され、除去されることになる。

#### D. 考察

アルギン酸ゲルで包摂したCNTの吸着剤としての特徴を、図-5のようなイラストによって以下のようにまとめることができる。CNTを内包したアルギン酸ゲルは、ベンゼン環を持つ有害物質を選択的に吸着・除去することのできる複合型の環境浄化剤である。アルギン酸ゲルは、「網」のような性質を持ち、吸着サイトであるCNTを固定するとともに、これらの吸着サイトをコロイドや腐植酸類などのようなサイズの大きい物質から守る役割を果たしている。アルギン酸ネット内に拡散することの出来る物質の中で、CNTと強く結合するものが、ゲル内に保持され除去される。CNTと作用しない物質あるいは結合しない物質、例えば、水や無機電解質などはCNTに保持されずに、ビーズ(吸着剤)を通過する。

#### E. 結論

アルギン酸ゲルで包摂したCNTは生体親和性が高く、生体内に侵入・存在する有害物質の除去にも使えるのではないかと期待されている

#### F. 健康危険情報

現時点で本研究において扱っている物質、ならびに実験の結果得られた新物質に関し、特に健康を害する危険な結果ならびに兆候に関する知見は得られていない。

#### G. 研究発表 論文発表

1. B. Fugetsu, S. Satoh, A. Iles, K. Tanaka, N. Nishi, F. Watari, *The Analyst* (London), 129, 565 (2004).

2. B. Fugetsu, S. Satoh, T. Shiba, T. Mizutani, Y. Nodasaka, K. Yamazaki, K. Shimizu, M. Shindoh, K. Shibata, N. Nishi, Y. Sato, K. Tohji, F. Watari, Bull. Chem. Soc. Jpn., 77, 1945 (2004).
3. B. Fugetsu, S. Satoh, T. Shiba, T. Mizutani, Y.-B. Lin, N. Terui, Y. Nodasaka, K. Sasa, K. Shimizu, T. Akaraka, M. Shindoh, K. Shibata, A. Yokoyama, M. Mori, K. Tanaka, Y. Sato, K. Tohji, S. Tanaka, N. Nishi, F. Watari, Environ. Sci. & Technol., 38, 6890-6896 (2004).
4. S. Satoh, B. Fugetsu, M. Nomizu, N. Nishi, Polymer J., 37, 94-101 (2005).

#### 学会発表

I. 生体に優しい可溶化カーボンナノチューブ、古月、佐藤、野田坂、柴、進藤、西、亘理、第26回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、平成16年1月、岡崎

#### II. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願 特になし

図-1 分散した CNT の AFM 写真

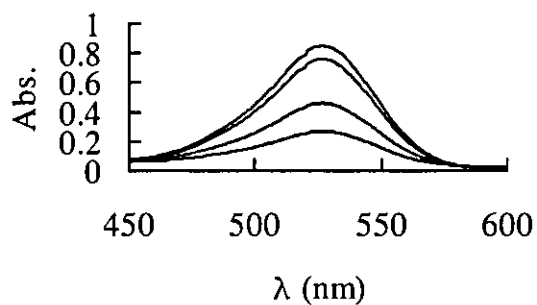
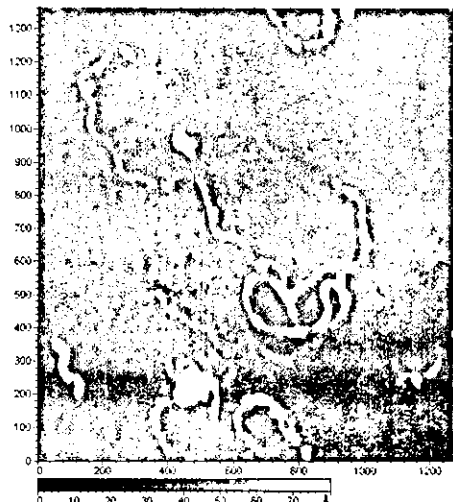


図-2 CNT をアルギン酸ゲルに封入する際に使用した装置の模式図

装置は、シリンジポンプ (A), 振動チャンバー (B), 振動システム (C, D), 同心ノズル (F), O型電極と静電気発生システム (G, E), 架橋イオン溶液 (H), 及びマグネット回転子 (I) から構成されている。

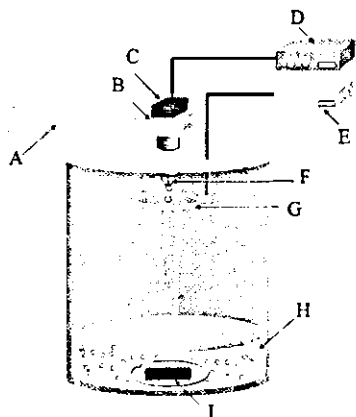


図-4 エオシン-B を吸着・除去する実験結果  
除去処理前の原液 (10.0 μM), カーボンナノファイバー内包ビーズ, 活性炭内包ビーズ, 及び多層 CNT 内包ビーズ (上から下への順) で処

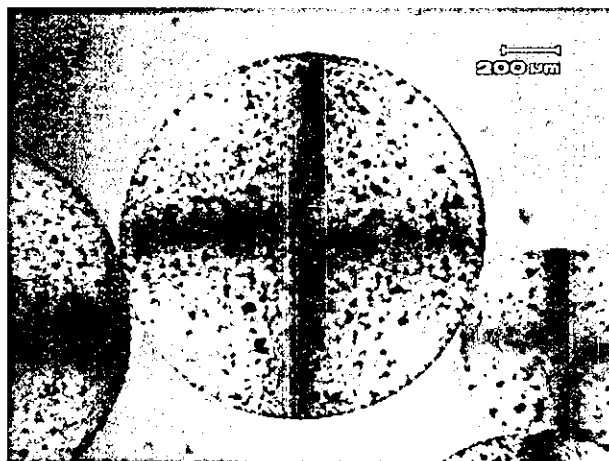
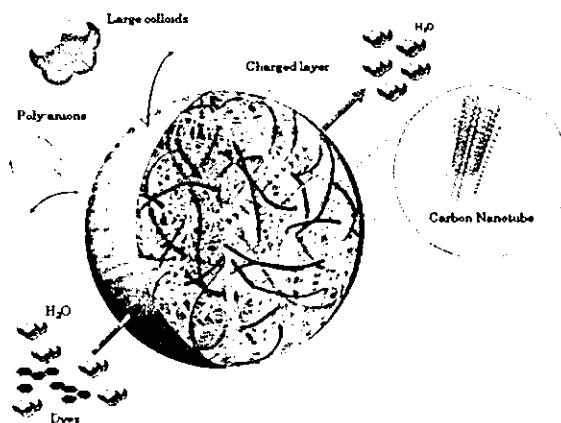


図-3 多層 CNT をアルギン酸ゲルに封入した状態の顕微鏡写真用いた CNT/アルギン酸ナトリウム混合コロイドの濃度は, 多層 CNT が 100ppm であり, アルギン酸ナトリウムが 1.2% である。



理した後の水溶液の吸収スペクトル。処理に用いた各種類のビーズの量は 3.0 ml;、処理に用いたエオシン-B 原液の体積は 15 ml。

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）  
分担研究報告書

X線を用いたナノクラスターキャラクタリゼーション手法の開発研究

分担研究者 巨理文夫 北海道大学歯学研究科教授  
研究協力者 朝倉清高 北海道大学触媒化学研究センター教授

X線を用いたナノレベル分析手法の開発に取り組むとともに、ナノチューブ中の不純物の構造を調べた。EXPEEMと呼ばれる新しいタイプの電子顕微鏡であり、ナノ領域の化学分析を可能にする。また、最後に新しい顕微分光法であるXANAMについても述べる。

### A. 研究目的

ナノチューブ、ナノ微粒子の生体適合性を調べ、DDSや組織代替材料に応用するためには、こうした微粒子の構造を生体環境またはそれに近い環境で調べる必要がある。この目的を達成するためには、透過力の大きな光であるX線が有効である。X線は内殻の電子を励起できるだけの十分なエネルギーを持つ光である。内殻電子は元素固有の束縛エネルギーで原子に結合しているため、X線の波長を掃引したり、飛び出してきた光電子の運動エネルギーを調べることで、元素の種類を特定し、その電子状態や周辺構造を調べることができる。こうした手法を用いてナノ粒子の構造解析やナノ領域の化学反応を追跡するための以下の3手法開発に取り組んでいる。

#### B1. 研究方法 XAFS法によるナノチューブ中の金属触媒の構造解析

X線のエネルギーを掃引して、その吸収スペクトルを測定すると、図1に示すように、特定のエネルギー位置でX線吸収係数が急激に増大する吸収端が現れる。この吸収端より高エネルギー側に現れる振動構造がXAFS

(X-ray Absorption Fine Structure) と呼ばれるものである。この振動構造は、光電子として放出された内殻光電子が周辺原子により散乱され、干渉しあうことで現れる。この振動構

造をフーリエ変換すると、動径分布関数に対応するものを与え、周辺原子までの結合距離や周辺原子の種類や配位数を決定することができる。我々は、カーボンナノロッドおよびチューブ中に存在する金属触媒の構造をこの手法で調べた。

実験は高エネルギー物理学研究機構放射光実験施設BL9Aにおいて行った。X線の波長掃引は、Si(111)2結晶モノクロメータによりおこなない、X線の検出は、電離箱（透過法）あるいはGe半導体検出器（蛍光法）を用いて行った。

その結果、金属未除去のカーボンナノロッド中に存在するNi触媒については、図2に示すような動径分布関数が得られた。解析の結果、ピークはNi-Ni結合に対応し、その結合距離0.248 nmであり、金属微粒子として存在することが分かった。また、配位数を解析すると、バルクNiと同じ配位数であったことから、10nmを越える比較的大きな金属微粒子で存在していることがわかった。さらに、Ni除去処理後については、蛍光法により測定した。蛍光強度より、Niの存在量は約100ppm程度であると推定された。Ni-Ni結合に対応するピークがわずかに観測される他、Ni-Cのピークが観測された。残存したNiは、Cと強く結合しているものと考えられる。多重散乱法による吸収端付近のスペクトル（図4）の解析から、図

表 1 PtPdのEXAFSより求めた配位数

Pd/Pt比	吸収端	結合	実測	Random 合金	Core-shell	cluster-in-cluster
4/1	Pd	Pd-Pd	6.9	7.5	7.7	8.2
		Pd-Pt	1.4	1.9	1.1	1.2
	Pt	Pt-Pd	6.1	7.5	4.5	4.7
		Pt-Pt	4.1	1.9	7.5	5.2
2/1	Pd	Pd-Pd	6.2	6.3	6.3	6.9
		Pd-Pt	2.8	3.1	1.9	2.4
	Pt	Pt-Pd	5.0	6.3	3.8	4.7
		Pt-Pt	5.7	3.1	8.2	5.0
1/1	Pd	Pd-Pd	5.1	4.7	4.5	5.6
		Pd-Pt	4.4	4.7	3.0	3.7
	Pt	Pt-Pd	3.2	4.7	3.1	3.7
		Pt-Pt	6.5	4.7	8.3	5.9
1/2	Pd	Pd-Pd	5.2	3.1	3.0	5.0
		Pd-Pt	5.8	6.3	3.8	4.7
	Pt	Pt-Pd	2.7	3.1	1.9	2.4
		Pt-Pt	5.6	6.3	8.9	6.9

5に示すようなNi dダイマー構造で、CNTに固定されていることがわかった。

#### D1. 考察

EXAFSは100ppmという微量な条件においても金属の構造を調べることができる。得られる情報は、金属の存在状態である。今回カーボンナノロッド中の金属の構造を調べたが、実際に生体に応用する場合は、金属を除去することになる。金属除去後の構造として、カーボンと強く結びついた状態で存在しており、カーボンナノロッドに強く結びつくことから、体内に長く残存し、蓄積される危険性がある。

#### E1. 結論

XAFSは、微量金属の構造を原子レベルで調べることができ、カーボンナノロッド中に微量に残存するNiはダイマー構造をなし、ナノロッドと強く結びついた状態で存在することがわかった。これは、体内に長く残り、蓄積する可能性がある。

#### B2. EXAFSによるナノクラスターの研究

EXAFS分光法は、ナノ超微粒子構造解析手法として、広く使われている。とくに、2元系合金ナノクラスターでは、それぞれの吸収端より構造解析を行うことができるため、他の手法では得られないような合金ナノクラスターの内部構造を知ることができる。これまで、合金ナノ粒子の内部構造として、一方の成分

が表面に出るcore-shell構造、二つの元素がランダムに混じり合うランダム合金構造が提案され、その2種類に分類されることが多かった。EXAFSを詳細に解析すると、それ以外にも同種成分どうしが集まり、ミクロクラスターを構成し、さらにそれが集まってナノクラスターを作るcluster-in-cluster構造や異種金属どうしがよりあつまるheterobondphilic構造などが存在することが示される。本稿では、こうした新しい合金ナノクラスターに関して報告する。

実験は高エネルギー物理学研究機構放射光実験施設BL12CおよびBL10Bにおいて行った。X線の検出は、電離箱（透過法）を用いて行った。

#### C2. 研究成果

##### 1 Cluster-in-Cluster構造 PtPdナノクラスター

PtとPdの塩を混ぜて、還元するとPtPdのナノクラスターを得ることができる。一般には、PtとPdの合金微粒子では、昇華熱の大きなPtがcore、Pdがshellになるcore-shell構造を作るとされている。

EXAFSからPtやPd周りのPtやPdそれぞれの配位数をもとめることができる。その結果を表1に示す。特定成分の全配位数が小さいと



表 2 CuPd のEXAFSより求めた配位数

Cu/Pd比	吸収端	結合	実測	Core-shell	random alloy	heterobond-philic
4:1	Cu K	Cu-Cu	6.0(0.5)	5.0	6.2	6.1
		Cu-Pd	1.8(0.4)	1.8	1.6	1.8
	Pd K	Pd-Cu	7.2(0.4)	7.3	6.2	7.0
		Pd-Pd	0.8(0.4)	4.7	1.6	0.7
3:2	Cu K	Cu-Cu	3.9(0.4)	3.6	4.7	3.2
		Cu-Pd	3.8(0.4)	2.6	3.1	4.2
	Pd K	Pd-Cu	5.5(0.5)	3.9	4.7	6.3
		Pd-Pd	2.2(0.5)	6.2	3.1	2.2
1:1	Cu K	Cu-Cu	2.8(0.5)	3.1	3.9	2.7
		Cu-Pd	5.0(0.5)	3.0	3.9	5.1
	Pd K	Pd-Cu	5.1(0.4)	2.9	3.9	5.1
		Pd-Pd	2.8(0.3)	6.6	3.9	2.7
1:4	Cu K	Cu-Cu	0.8(0.6)	0.9	1.6	0.7
		Cu-Pd	7.0(1.0)	4.5	6.2	7.0
	Pd K	Pd-Cu	1.8(0.4)	7.4	1.6	1.8
		Pd-Pd	6.0(0.4)	1.1	6.2	6.1

いうCore-shell構造の特徴も見ることができない。また、どの組成においても同種の配位数が異種間の配位数より大きい。これらの配位数における特徴は、同一成分がまず寄り集まり、さらに大きなクラスターを作るcluster-in-cluster構造により説明することができる。こうしたcluster-in-cluster構造を作る要因として、PdとPtの還元反応の早さや熱力学的な還元されやすさの差が上げられる。すなわち、PdはPtより還元反応が早く進行し、最初にPdが還元される。Pdのナノクラスターができるとそれが触媒になり、Ptが還元されはじめるが、Ptと一緒にPdが還元されると、熱力学的に安定なPtイオンによりPdは再びイオン

化されるため、両者の合金はできにくいものと解釈される。

## 2. heterobondphilic 構造 CuPdナノクラスター

一方CuとPdのナノクラスターでは、全く反対の傾向が観測される。すなわち、表2に示すとおり、異種結合の配位数が同種結合の配位数よりも大きい。これは、CuとPdが強い結合をつくるため、異種結合が優先的に生成する合金ナノクラスター、すなわちheterobondphilic CuPdナノクラスターができた

ためであると考えられる。

## E2. 結論

EXAFSは、ナノクラスター特にその合金ナノクラスターの構造を原子レベルで調べることができ、Cluster-in-cluster構造やheterobondphilic構造など新しいナノクラスター構造を提案できた。

## B3. 実験方法—EXPEEM法の開発

EXPEEM(energy filtered X-ray photoemission electron microscopy)法は、ミクロンからナノの領域における元素分析能をもち、非破壊性も高いという特徴を有する。さらに、ガス共存下でのin-situ分析も可能である。われわれは、光軸が直線上になるWien filterをエネルギー分析器として持つEXPEEM装置を開発した。(図6) Wien filter中では、電場Eと磁場Bを直交して存在する空間をもつ。この空間を電子が走ると、電場と磁場からお互いに反対向きの力を受ける。磁場から受けるローレンツ力は、電子の速度に比例することから、特定の運動エネルギーを持つものだけが直進する。この直進した電子を選別することで、電子の運動エネルギー分析し、表面の化学マッピングが可能となる。

## C3. 実験結果

放射光を用いて、我々は、Au/Taの元素分解能を1-2 $\mu$ mという空間分解能をもつ光電子放出顕微鏡像を高エネルギーX線領域ではじめて測定するこ

とができた。図7に光電子の運動エネルギーを分析したEXPEEM像を示す。0-90 eVの運動エネルギーで結像するとほぼ、Au領域が明るい。これは、Au領域から放出される光電子が多いためである。一方Ta3p<sub>5/2</sub>のピークを用いて結像した場合Ta領域の方が明るくなる。

### D3. 考察

これまで、Wien filterを用いたEXPEEMは感度が小さく、実用化は難しいと考えてきたが、本研究によりその可能性が示された。現在さらに、Wien filterの高感度化の取り組みを続けている。その結果、図8にしめすようなEXPEEM像を実験室系のX線源で取得できるようになった。

### E3. 結論

X線を用いたnmオーダーの元素マッピングを可能とするEXPEEM法を開発した。より高い感度に成功した。

### B4. 実験方法—XANAM法の開発

NC-AFM法は、表面の原子分解能像を与える手法であり、ポリマーや絶縁体にも適応可能な手法である。ところが、表面の元素の分布に関しては、通常得ることが難しい。元素分析能を得るためには、表面との相互作用が変化することが必要である。表面との主な相互作用の要因として、最近表面とNC-AFMチップ先端の共有結合力が重要な役割を果たすと言われている。化学結合は、HOMOとLUMOが関与するものであり、これらの軌道の電子密度を元素や化学状態にしたがって外部から制御できれば、原子間力を元素や化学状態ごとに人為的に変化させ、元素分析、化学分析能を非接触原子間力顕微鏡に持たせることができると考えられる。すなわち波長可変X線を用いて、元素固有の結合エネルギーを持つ内殻電子をLUMOへ励起することで、元素や化学状態に応じて、原子間力を制御できる可能性がある。この原理の妥当性をしらべるため、Si基板上にAu薄膜を蒸着し、X線を照射しながら、力の定数の変化を調べた。

### C4. 結果

その結果、図9 Au薄膜上にNCAFM探針先端をおいたときのみ、Au L3吸収端と同じエネルギーをもつX線により、原子間力が変化を示した。また、Auの存在しないSi表面上では、X線に対して、力の定数の変化がない。

### D4. 考察

以上の結果より、X線を併用しながら、NC-AFMを掃引することで、表面元素の原子レベル分布を出ることができると期待される。われわれはこの新手法をXANAM(X-ray aided non-contact atomic force microscopy)と名付けた。

### F. 健康危険情報

NiがCNTを合成するとき触媒として使われているが、生体適合材料としてCNTを使う場合、微量なNiが残留し、それが強くCNTに固定化されているため、体内に長期間とどまることが予想される。Niがアレルゲンであることを考えると、Niを利用した生体適合CNT製造を控え、代替金属(Feなど)に切り替えていく必要がある。

### G. 研究発表

1. H. Niimi, M. Kato, M. Kudo, T. Kawasaki, W.J. Chun, S. Suzuki and K. Asakura, *Development of imaging energy analyzer using multipole Wien Filter*. Appl.Surf.Sci., 2005. **241**: p. 131.
2. K. Asakura, W.J. Chun, K. Tohji, Y. Sato and F. Watari, *XAFS studies on the local structures of Ni impurities in a CNT*. Chem Lett., 2005. **34**(3): p. 382.
3. T. Naito, T. Inabe, N. Niimi and K. Asakura, *Light induced transformation of molecular materials into devices*. Advanced Materials., 2004. **16**: p. 18.
4. S. Suzuki, Y. Koike, K. Fujikawa, W.-J. Chun, M. Nomura and K. Asakura, *A possibility of XANAM(X-ray Aided Non-contact Atomic Force Microscopy)*. Chem.Lett., 2004. **33**(5): p. 636-637.
5. H. Niimi, T. Tsutsumi, H. Matsudaira, T. Kawasaki, S. Suzuki, W.J. Chun, M. Kato, Y. Kitajima, Y. Iwasawa and K. Asakura, *Recent progresses in an energy filtered high energy XPEEM using a Wien filter type energy analyzer*. Appl.Surf.Sci., 2004. **237**: p. 641-644.
6. H. Yasufuku, Y. Ohminami, T. Tsutsumi, H. Niimi, N. Matsudaira, K.

- Asakura, M. Kato, Y. Sakai, Y. Kitajima and Y. Iwasawa, *Observation of element specific energy filtered X-ray Photoemission electron microscopy(EXPEEM) images of Au on Ta using a Wien filter type energy analyzer.* Jpn.J.Appl.Phys., 2004. **43**(11): p. 7682-7688.
7. 朝倉清高, PEEM, 表面科学の基礎と応用 (表面科学会編、NTS) (2004) p 683.
  8. K. Asakura, 軟X線(1-3keV)を用いた内殻励EXPEEMによる表面化学マッピングの可能性について, PF NEWS, 2004. **21**: p. 28-32.
  9. W.J. Chun, K. Ijima, Y. Ohminami, S. Suzuki and K. Asakura, *Theoretical Debye Waller Factors of  $\alpha$ -MoO<sub>3</sub> Estimated by an Equation-of-Motion Method.* J.Synchrotron Rad., 2004. **11**: p. 291-294.
  10. K. Ijima, Y. Koike, W.-J. Chun, Y. Satio, Y. Tanizawa, T. Shido, Y. Iwasawa, M. Nomura and K. Asakura, *A local structure of low coverage Ni species on the  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(0001) surface- a polarization Dependent XAFS studies.* Chem,Phys.Lett., 2004. **384**: p. 134-138.
  11. Y. Iwasawa, K. Asakura, Y. Sakai and M. Kato, 化学分析用複合放出電子顕微鏡装置, 特許.3533335,(2004)
  12. K. Asakura, "Recent development in the in-situ XAFS and related work for the characterization of catalysts in Japan.", Cataly. Surv. Asia, 7,177-182(2003).
  13. Y. Tanizawa, T. Shido, Y. Iwasawa, M. Nomura, W.-J. Chun and K. Asakura, "Three-dimensional local structure analysis of Cu species on TiO<sub>2</sub>(110) surface studied by polarization-dependent total reflection fluorescence X-ray absorption fine structure(PTRF-XAFS)", J.Phys.Chem., 107,12917-12929(2003).
  14. S. Suzuki, Y. Ohminami and K. Asakura, "Well-defined inhomogenous catalysts-their reactivity and characterization", Petrotec, 26,206-210(2003).
  15. S. Suzuki, Y. Ohminami, T. Tsutsumi, M. M. Shoib, M. Ichikawa and K. Asakura, "The first observation of a non-contact AFM image of MoO<sub>3</sub>(010) on an atomic level", Chem.Lett., 32,1098(2003).
  16. T. Tsutsumi, Y. Ohminami, K. Asakura, H. Yasufuku, M. Kato, Y. Sakai, Y. Kitajima and Y. Iwasawa, "Observation of Energy-filtered Images and Energy Dispersive images of Au/Ta photoelectron by EXPEEM with a Wien Filter Type Energy Analyzer", 表面科学, 24,509-511(2003)
  17. T. Kawai, S. Sato, W. J. Chun, K. Asakura, K. K. Bando, T. Matsui, Y. Yoshimura, T. Kubota, Y. Okamoto, Y. K. Lee and S. T. Oyama, "In situ XAFS studies on the structure of nickel phosphide catalyst supported on K-USY", Chem.Lett., 32,956-957(2003).
  18. S. T. Oyama, R. Radhakrishnan, M. Seman, J. N. Kondo, K. Domen and K. Asakura, "Control of reactivity in C-H bond breaking reactions on oxide catalysts: Methanol oxidation on supported molybdenum oxide", Journal of Physical Chemistry B, 107,1845-1852(2003).
  19. C. R. Bian, S. Suzuki, K. Asakura, L. Hei and N. Toshima, "EXAFS studies on the structure of the PVP-Stabilized Cu/Pd particles colloiddally dispersed in solution", J.Phys.Chem., 106,8587-8598(2002). Yamaguchi, A.; Suzuki, A.; Shido, T.; Inada, Y.; Asakura, K.; Nomura, M.; Iwasawa, Y.; J.Phys.Chem. 2002, 106, 2415-2422.
  20. Yasufuku, Y. Ohminami, T. Tsutsumi, K. Asakura, M. Kato, Y. Sakai, Y. Kitajima and Y. Iwasawa, "Observation of Energy Filtered Image for X-ray Photoemission Electron Microscopy(XPEEM) Using a Retarding Wien Filter Energy Analyzer", Chem.Lett, 842(2002).
  21. A. Yamaguchi, A. Suzuki, T. Shido, Y. Inada, K. Asakura, M. Nomura and Y. Iwasawa, "In-situ time-resolved energy dispersive XAFS study on the decarbonylation processes of Mo(CO)<sub>6</sub> entrapped in NaY and HY zeolites", J.Phys.Chem., 106,2415-2422 (2002).
  22. T. Shido, A. Yamaguchi, Y. Inada, K. Asakura, M. Nomura and Y. Iwasawa, "Dispersive XAFS study on Cu and Mo species in zeolites during the

catalyst preparation", *Topics in Catal.*, **18**, 53 (2002).

23. R. S. Mulukutla, T. Shindo, K. Asakura, T. Kogure and Y. Iwasawa, "Characterization of rhodium oxide nanoparticles in MCM-41 and their catalytic performances for NO-CO reactions in excess O<sub>2</sub>", *Applied Catalysis A*, **228**, 305-314 (2002).

24. K. Ijima, Y. Ohminami, S. Suzuki and K. Asakura, "Polarization dependent EXAFS measurements of an alpha-molybdenum trioxide single crystal", *Topics in Catal.*, **18**, 125-127 (2002).

25. 田旺帝、朝倉清高 "XAFS シリーズ (15) In-situ 偏光全反射蛍光 XAFS (in-situ PTRF-XAFS) 法", 放射光, **15**, 363-366 (2002)

10.

## 発表

1. 朝倉清高. 新しい顕微法による化学マッピング法: 触媒表面観察の可能性. 性研短期研究会. 2004. (柏).

2. 朝倉清高 鈴木秀士. 新美大伸. 新しい顕微法と触媒表面観察の可能性. in 日本顕微鏡学会シンポジウム. 2004. (名古屋).

3. 朝倉清高. *Wien filter* 型 EXPEEM の可能性. 24 回表面科学講演大会. 2004. (早稲田大学).

4. 朝倉清高 放射光を用いた X 線顕微分光と触媒化学] EXPEEM 法と XANAM 法. JEOL User Group Meeting. 2004. (東京).

5. 朝倉清高. EXAFS 法による超微粒子構造解析. コロイドおよび界面討論会. 2004 (山口東京理科大学).

6. 佐藤慎祐, 新美大伸, 鈴木秀士, 田旺帝, 朝倉清高, 色川勝巳 黒田晴雄. 6 赤外自由電子レーザーにより, 誘起される固体表面反応. 第 5 回黒田シンポジウム. 2004 (東京).

7. 朝倉清高, 偏光全反射蛍光 XAFS による金属-担体相互作用の研究. SPring-8 触媒評価研究会 2004 (京都).

8. K. Asakura, *Metal-Support Interaction Studied by 3 dimensional XAFS*. 2004, Academia Sinica: Taipei.

9. K. Asakura, *Chemical Mapping of Surfaces using Energy-filtered X-ray Emission Electron Microscopy and X-ray Aided Non-contact Atomic Force Microscopy*. 2004, SRC: Taiwan.

10. 堤哲也, 新美大伸, 松平宣明, 川崎貴博, 朝倉清高, 安福秀幸, 嘉藤 誠, 北島義典, 岩澤康裕. 「Wien filter を用いた EXPEEM 法の現状と可能性」. 東京大学物性研究所短期研究会 「LEEM/PEEM をもちいた表面研究の新しい展開」. 2004, (柏市).

11. K. Asakura, *Chemical Mapping of Catalyst Surfaces using X-ray Photo Emission Electron Microscopy and Probe Microscopy*. 2004, (Berlin).

12. 鈴木秀士, 小池祐一郎, 藤川敬介, 田旺帝, 野村昌治朝倉清高. X 線と NC-AFM による元素マッピング法への可能性. 触媒討論会. 2004 (仙台).

13. 河合秀俊, S.T.Oyama 田旺帝, 朝倉清高, 阪東恭子, 葭村雄二, Yong-kul Lee. Ni<sub>2</sub>P 脱硫触媒の高温高压下 in-situ XAFS 測定. XAFS 討論会, 2004, (京都).

14. T.K. H. Niimi, W-J. Chun, S. Suzuki, M. Kato, M. Kudo, and K. Asakura. An Aberration-Corrected Multipole Wien Filter Energy Analyzer for Energy Filtered X-ray Photoemission electron microscopy (EXPEEM). LEEM-PEEM IV. 2004. Twente.

15. 朝倉清高. 赤外自由電子レーザーを用いた固体表面の触媒反応制御の可能性. 科研費学術創成研究「赤外自由電子レーザーの高性能化とそれを用いた光科学成果報告会. 2004 (東京).

16. 鵜城真優子, 宇野奏絵, 朝倉清高, 藤川高志 Ni K-edge XANES によるカーボンナノチューブ中の Ni の構造解析. 日本物理

学会. 2005 (東京) .

17. Y.Koike, W.-J. Chun, K. Ijima, Y. Tanizawa, and Y.Iwasawa, T.Shido, Ki. Asakura. *Polarization Dependent Extended X-ray Absorption Fine Structure Studies on Metal-Oxide Interface Structure*. in *13th International Congress on Catalysis*. 2004 (Paris).
18. 新美大伸、嘉藤誠、川崎貴博、宮本剛志、鈴木秀士、田旺帝、工藤政人、工藤政都、河原直樹、堂井真、塚本勝美、朝倉清高、高次収差補正型多極子Wienフィルタを用いた実験室サイズエネルギー選別X線光電子放出顕微鏡の開発. 表面科学会. 2004(東京).
19. 堤哲也、新美大伸、松平宣明、川崎貴博、朝倉清高、安福秀幸、嘉藤誠、北島義典、岩澤康裕、”アンジュレーター放射光を用いたEXPEEMによるTa3d光電子エネルギー選別像の観察”, 第17回放射光学会, つくば, 2004/1/9
20. H.Kwawai, S.Sato, W.-J.Chun, K.Asakura, K.-K.Bando, T.Matsui, Y.Yoshimura, T.Kubota, Y.Okamoto, Y.-K. Chen, T.S.Oyama, “In-situ X-ray Absorption Fine Structure Studies on the Structures of NiP2 in USY Zeolite”, 18<sup>th</sup> North American Meeting of Catalysis, Mexco Cancun, 2003/6/5/,
21. 朝倉清高,”放射光によるナノチューブ観察”, 日本顕微鏡学会第59回学術講演会, 札幌, 2003/6/9
22. K.Asakura, H. Niimi, T.Tsutsumi, H.Matsudaira, T.Kawasaki, S.Suzuki, W-J. Chun, M.Kato, Y.Kitajima and Y.Iwasawa,”Recent Progresses in an Energy-Filtered High Energy X-ray Photoemission Electron Microscopy Using a Wien Filter Type Energy Analyzer”, ACSIN, Nara, 2003/11/20
23. 新美大伸(北大触七) 嘉藤誠(JEOL) 堤哲也(北大触七) 田旺帝(北大触七) 鈴木秀士(北大触七), ”多極子フィルター型イメージング光電子分光器の開発”, 第64回応用物理学学術講演会, 福岡大学, 2003/8/30
24. W.-J. Chun C.-R. Bian S. Suzuki L. Ping K. Asakura,”Heterobondphilic structure of the PVP-Stabilized Cu/Pd Nanoclusters”, XAFS12, Malmo, 2003/6/24
25. W. -J. Chun K. Ijima Y. Ohminami S. Suzuki K. Asakura,” Debye-Waller Factor Calculation of  $\alpha$ -MoO<sub>3</sub> by Equation-of-Motion Method”, XAFS12, Malmo, 2003/6/26
26. Kaoru Ijima, Yuichiro Koike, Wong-Jae Chun, Kiyotaka Asakura, Masaharu Nomura, Yasuhiro Tanizawa, Takafumi Shido and Yasuhiro Iwasawa, “Polarization Dependent XAFS Studies on a Low Coverage of Ni at the  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(0001) Surface.” XAFS12, Malmo, 2003/6/26
27. T. Kawai, S.Sato, W.-J. Chun, K. Asakura, K. K. Bando, Y. Yoshimura, T. Kubota, T. Okamoto, Y.-K. Lee, and S. T. Oyama,” In situ XAFS Studies on the Structure of Nickel Phosphide Hydrodesulfurization catalysis supported on USY Zeolite”, XAFS12, Malmo, 2003/6/26
28. 堤哲也、安福秀幸、新美大伸、松平宣明、田旺帝、朝倉清高(北大触七) 嘉藤誠、境悠治、北島義典、岩澤康裕”EXPEEM法の開発と表面化学マッピングの可能性”, 第92回触媒討論会, 徳島, 2003/9/18
29. 田旺帝、居島薫、大南祐介、鈴木秀士、朝倉清高,”EM法による単結晶 $\alpha$ -MoO<sub>3</sub>の温度変化偏光EXAFS解析”, 第92回触媒討論会, 徳島, 2003/9/18
30. 鈴木秀士、大南祐介、堤哲也、M.M.M. Shoaib、朝倉清高,”NC-AFMによるMoO<sub>3</sub>(010)表面の原子レベル構造観察”, 第92回触媒討論会, 徳島, 2003/9/18
31. 河合寿秀・佐藤慎祐・田旺帝・朝倉清高・阪東恭子・松井高史・葭村雄二・久保田岳志、岡本康昭, Yong-Kul Lee, S. Ted Oyama, “In situ XAFSを用いたNi<sub>2</sub>P/KUSY触媒の脱硫反応条件下における構造研究”, 第92回触媒討論会, 徳島, 2003/9/18
32. 河合寿秀、朝倉清高、C. Sergeant, M. Vesvres, M. Pravikoff, G. Deves, M. Simonoff, K. Guerman, C. Hennig, T. Reich, ”XAFS法を用いた小麦中のTc化合物の構造研究”, 第6回XAFS討論会, 千葉大学, 2003/9/25
33. 谷沢靖弘、田旺帝、朝倉清高、紫藤貴文、岩澤康裕,”偏光全反射蛍光XAFS法によるTiO<sub>2</sub>(110)表面上のCuクラスターの立体構造解析”, 第6回XAFS討論会, 千葉大学, 2003/9/26
34. 小池祐一郎、居島薫、藤川敬介、田旺帝、朝倉清高、岩澤康裕,”偏光全反射蛍光

- XAFS法を用いたTiO<sub>2</sub>(110)上の低担時量におけるNiの三次元構造解析”, 第6回XAFS討論会, 千葉大学, 2003/9/26
35. 藤川 敬介, 鈴木 秀士, 朝倉 清高, “TiO<sub>2</sub>(110)表面上におけるNiクラスターのSTM観察”, 第23回日本表面科学会, 早稲田大学, 2003/11/26
36. 松平 宣明, 大南 祐介, 堤 哲也, 鈴木 秀士, 田 旺帝, 吉富敦司, 武笠幸一, 永瀬 雅夫, 朝倉 清高, “表面規整された酸化物モデル触媒の作製”, 第23回日本表面科学会, 早稲田大学, 2003/11/26
37. 朝倉清高、安福秀幸、大南祐介、堤 哲也、北島義典、嘉藤 誠、境 悠治、岩澤康裕 “放射光を用いたX線光電子放射顕微鏡の開発と固体表面のエネルギー選別像の観測” 日本化学会第 81春季年会, 早稲田大学(2002/03/27)
38. 安福秀幸, 朝倉清高、大南祐介、堤 哲也、北島義典、嘉藤 誠、境 悠治、岩澤康裕, “放射光を用いたWien Filter型X線光電子放射顕微鏡によるエネルギー選別像の観測”, 第49回応用物理学関係連合講演会, 東海大学(2002/03/27)
39. 鈴木あかね・山口有朋・千原貞次・紫藤貴文・稲田康宏・朝倉清高・野村昌治・岩澤康裕 “時間分解 DXAFS 法による担持[Ru<sub>6</sub>C]クラスター触媒の構造速度論に関する研究” 日本化学会第 81春季年会, 早稲田大学(2002/03/27)
40. 鈴木あかね・山口有朋・千原貞次・稲田康宏・紫藤貴文・朝倉清高・湯浅真・阿部正彦・野村昌治・岩澤康裕 “In-situ 時間分解 DXAFS によるRu クラスター触媒の構造速度論に関する研究” 第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/1)
41. 鈴木あかね・山口有朋・千原貞次・稲田康宏・紫藤貴文・朝倉清高・湯浅真・阿部正彦・野村昌治・岩澤康裕 “in-situ 時間分解 DXAFS 法によるRh/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 触媒の構造変化に関する研究”, 第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/1)
42. 河合寿秀、佐藤慎祐、朝倉清高、阪東恭子、松井高史、葭村雄二、久保田岳志、岡本康昭、Yong-Kul Lee、S.Ted Oyama, “In situ EXAFS を用いたニッケル-リン化合物脱硫触媒の構造研究” 第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/1)
43. Cui-Rong Bian, 朝倉清高, Lu Ping, 戸嶋直樹, “EXAFS によるCuPd 合金超微粒子の構造” 第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/2)
44. 能登屋康晴、早川久仁子、藤川高志、金崎真吾、紫藤貴文、朝倉清高、岩澤康裕, “多重散乱理論によるC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/Pt/SiO<sub>2</sub> 系のL-edge XANES スペクトル解析” 第4回XAFS討論会 広島大学(2002/8/2)
45. 堤哲也、大南祐介、朝倉清高、安福秀幸、嘉藤誠、境悠治、北島義典、岩澤康裕, “Wien Filter型EXPEEMによるAu/Taの光電子エネルギー選別像と分散像の観測”, 第22回日本表面科学会, 早稲田大学 (2002/11/27)
46. 河合寿秀・佐藤慎祐・朝倉清高・坂東恭子・松井高史・葭村雄二・久保田岳志・S. Ted Oyama・Yong-Kul Lee, “EXAFSを用いたニッケル・リン化合物脱硫触媒の構造研究”, 第90回触媒討論会、浜松、(2002/9/21)
47. 朝倉清高・Cui-Rong Bian・戸嶋直樹・Lu Ping, “高分散Cu-Pdヘテロボンドフィリック合金クラスターの構造解析”, 第90回触媒討論会、浜松、(2002/9/21)
48. 朝倉清高 “EXPEEM”, 第7回 CREST 成果報告会 京都, 2002. 5. 29
49. 朝倉清高 “触媒におけるPdの反応特性” 平成14年歯科理工学会 北海道東北支部 夏期セミナー、キロロ、2002. 7. 20
50. 朝倉清高, “表面化学反応と表面リアルタイムマッピング”, 第3回ナノテク支援ワークショップ, SPring8 2002. 11. 10

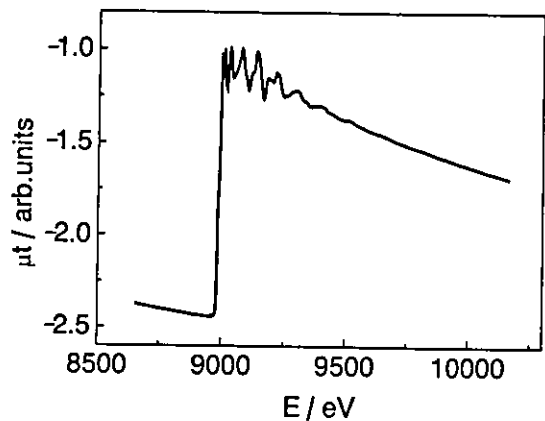


図1 Cu K吸収端XAFS スペクトル

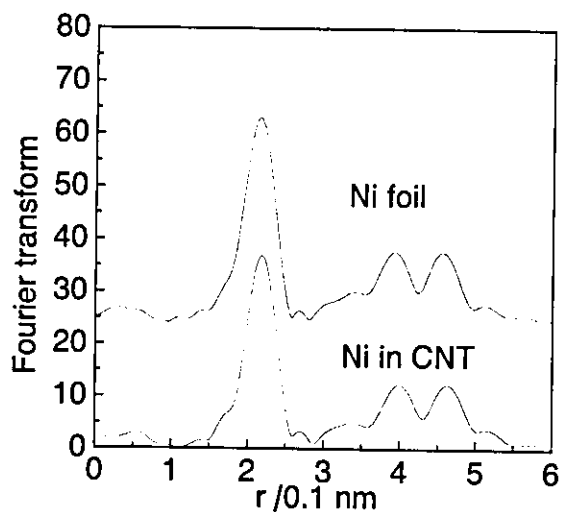


図2 フーリエ変換 上: Ni foil、下: CNT中のNi(未洗浄)

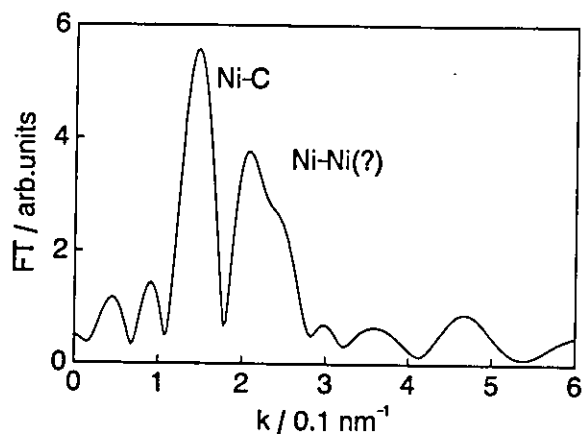


図3 洗浄処理後のNiのフーリエ変換

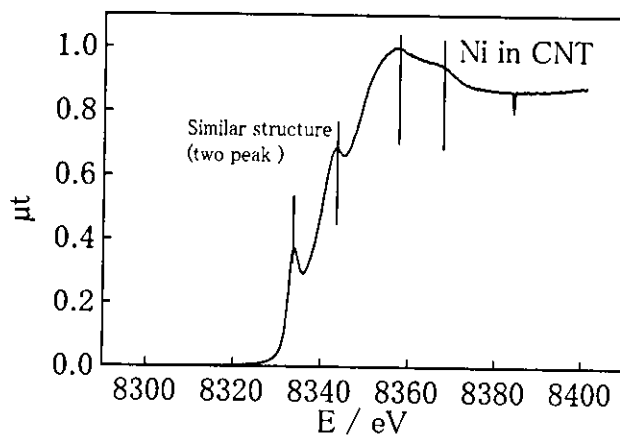


図4 カーボンナノロッド中のNiのXANES スペクトル(Ni除去処理後)

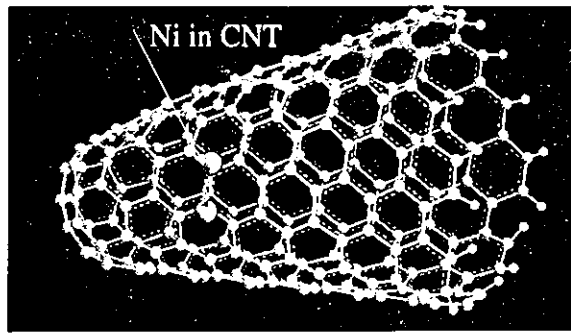


図5 モデル構造

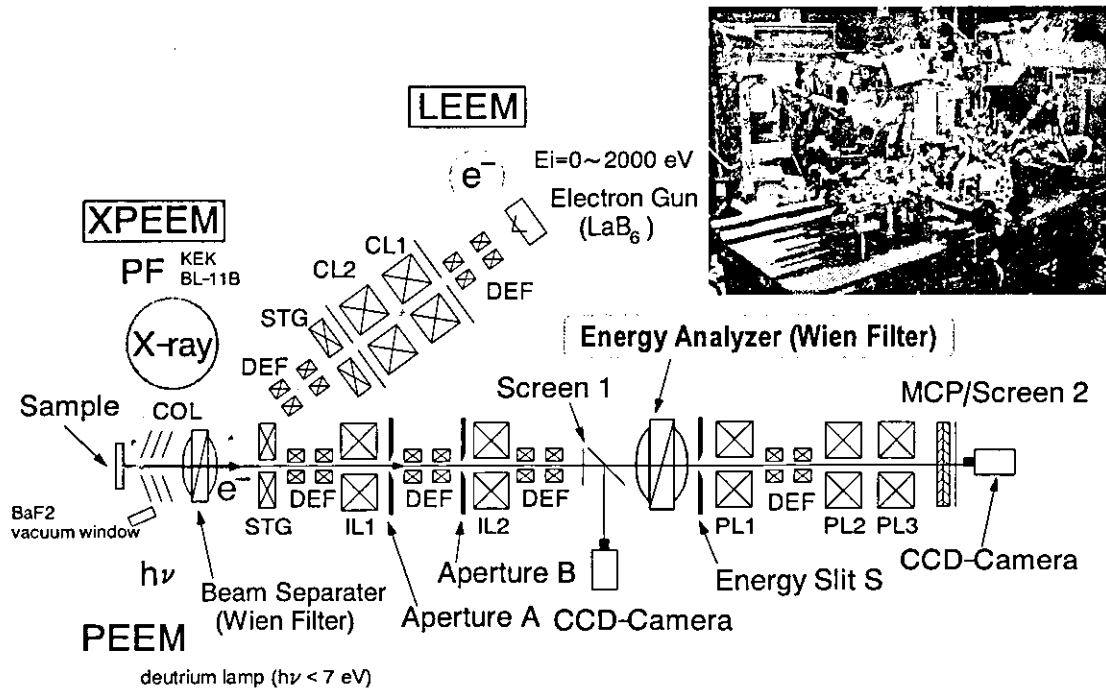


図6 EXPEEM装置の概念図

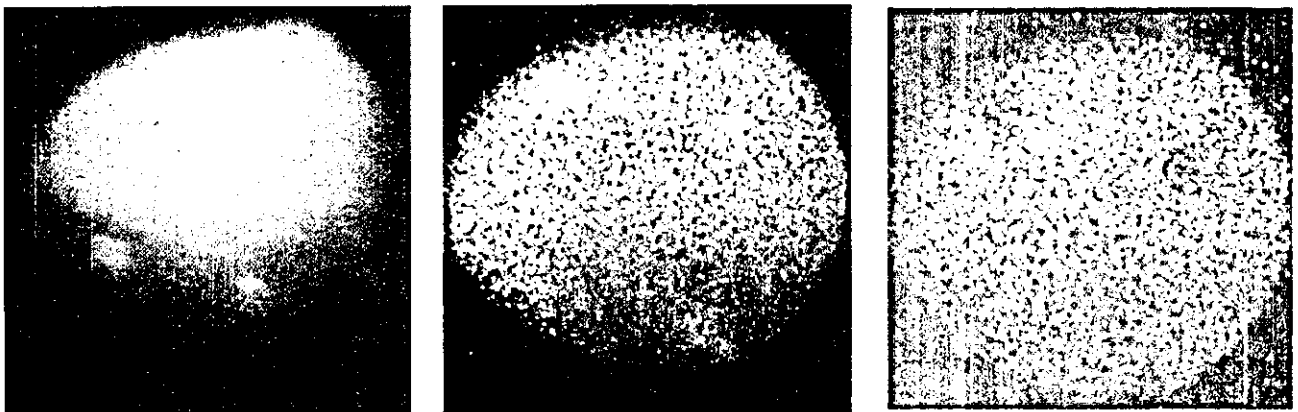


図7 PFで取得したEXPEEM像：それぞれ、0eV付近の2次電子(a)、Au $3d_{5/2}$ 光電子(b)、Ta $3d_{5/2}$ 光電子(c)を選別し、結像した。像のため込み時間は10 sec(a)、60 min(b)、30 min(c)である。光子エネルギーは2380 eVである。



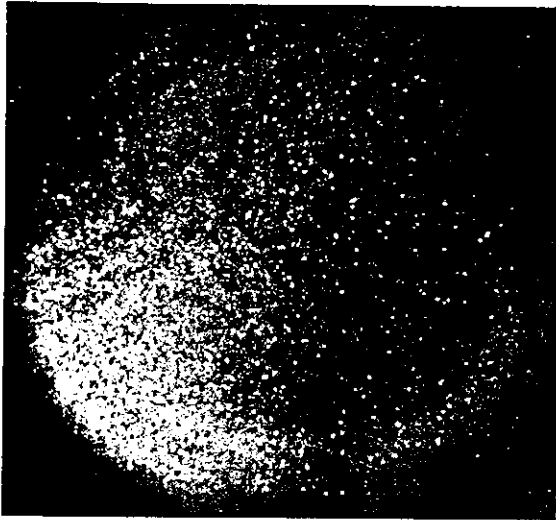


図8 新型XPEEMによるNi メッシュ像

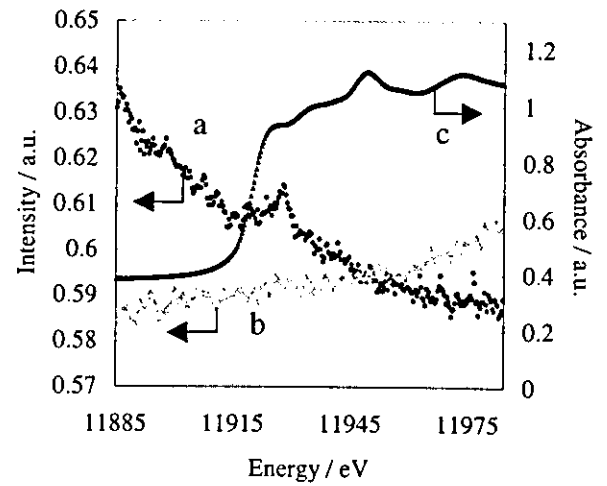


図9 X線によるNC-AFMチップ先端と表面との相互作用の変化  
 (a)チップ先端をAuにおいた場合のX線による力の変化(b) チップ先端をSiにおいた場合のX線による力の変化  
 エネルギースキャン範囲はAuのL3吸収端付近、(c)比較のためのAu L3吸収スペクトル

分担研究報告書

カーボンナノチューブの細胞に対する影響  
—細胞増殖と抗酸化機能に関して—

柴 肇<sup>1</sup>、古月文志<sup>2</sup>、進藤正信<sup>3</sup>、向後隆男<sup>3</sup>、亘理文夫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>富士レビオ(株)先端研究部、<sup>2</sup>北海道大学大学院地球環境科学研究科

<sup>3</sup>北海道大学大学院歯学研究科

研究要旨

カーボンナノチューブ(CNT)の細胞毒性や細胞増殖に対する影響は種々の方面から解析されつつあるが、現状では未知の部分が多い。また、生体内で何らかの生理機能を示すかどうかに関しても、未だに明確できていない。そこで我々は、ヒト由来の一般的な正常細胞として、真皮繊維芽細胞を用いて、その増殖に対してCNTが何らかの影響を示すかどうか確認した。材料としては、アルギン酸によって分散され可溶化されたCNT(可溶化CNT)を用いた。細胞の増殖をMTS法によりモニターしたところ、培養7日目までコントロールと同様の増殖及び生存を示し、CNTによる影響は全く観察されなかった。また、CNTの生理機能を見出すべく、その可能性の1つとしてCNTの抗酸化作用を計測してみた。その結果、可溶化CNT及び可溶化処理を施していない超音波分散CNTの両方において、抗酸化作用は検出されなかった。ただし、超音波によって分散化したCNTにおいては、抗酸化作用とは逆に活性酸素が生成する可能性も見出され、超音波処理したフラーレンで確認されている活性酸素の生成現象がCNTでも起こりうる可能性も否定できないと思われる。また、カーボンナノチューブ(CNT)をアルギン酸ビーズに内包し、細胞(Balb 3T3)を用いて、その増殖に対してCNTが何らかの影響を示すかどうか確認した。材料としては、アルギン酸ビーズに内包したCNT及び活性炭、コントロールとして何も含まないアルギン酸ビーズを用いた。細胞の増殖をMTS法によりモニターしたところ、コントロールと同様の増殖及び生存を示し、CNTによる影響は全く観察されなかった。また、細胞毒性を指標として、CNTを内包したアルギン酸ビーズへの芳香族化合物の吸着力の程度を評価した。CNTを内包したアルギン酸ビーズをマイトマイシンC(MMC)を加えた培養液中に懸濁、混和しながら放置した。その後、遠心によりビーズを分離し、上清の培養液を用いて細胞(Balb 3T3)を培養して、MMCの毒性を評価した。CNTを内包したビーズがMMCを吸収して培地中のMMC濃度が下がれば、細胞毒性も低下するはずである。コントロールとして何も含まないビーズ、活性炭を含むビーズを用いて同様の実験を行った。その結果CNTを含むビーズ、活性炭を含むビーズで処理した培養液ともに、何も内包しないビーズで処理した培養液とほぼ同等の細胞毒性を示した。したがって本実験の条件では、CNTによるMMCの吸着除去効果は観察されなかった。ただし、活性炭を内包するビーズでも効果がなかったことから、内包されているCNTや活性炭の量に比べてMMCの濃度が高すぎて、吸着のキャパシティを超えていた可能性もある。今後さらに吸着量とのバランスを考えて評価を行う必要がある。

1. MTS法を用いた細胞生存率測定  
によるカーボンナノチューブの細胞増殖  
促進物質としての機能評価

HF(human fibroblast)の生育に対してカーボ  
ンナノチューブが与える影響について評価した。

B. 研究方法

A. 研究目的

古月らの方法により可溶化した0.1 µg/mlの

カーボンナノチューブ(可溶化 CNT)、およびそれを含まないコントロール溶液(可溶化溶媒)を、精製水によって5倍希釈しオートクレーブ滅菌した。これらを滅菌済み精製水によってさらに希釈し、4倍希釈系列(20、5、1.25、0.313、0.0781 ng/ml および 5、20、80、320、1280 倍希釈)をそれぞれ調製した。調製した希釈系列と5%のFBSを含むDMEM培地を1対9の比で混合し、終濃度2、0.5、0.125、0.0313、0.00781 ng/mlの可溶化CNT、および50、200、800、3200、12800倍希釈のコントロール溶液を含む培地を調製した。

HF(p17)を、96穴プレート3枚(各60穴)に2000 cell/wellずつまき、10% FBSを含むDMEM培地200  $\mu$ lで37°Cにおいて3日間培養した。培養液を除去後、上記の可溶化CNTもしくはコントロールを含む培地200  $\mu$ lを5穴ずつ加え、37°Cにおいて培養を継続し、処理を開始した。

処理後1、2、7日目の細胞生存率をMTS法により確認した。MTS法はPromega社製CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kitを用い、そのプロトコールに従った。

## C. 研究結果

HFを可溶化CNTおよびコントロール処理後、1、2、7日目の細胞生存率をMTS法により測定した結果をそれぞれ図1、2、3に示す。但し、生存率はMTS処理120分後の $A_{490}$ の値から求め、次式より計算した。

生存率(%) = (各処理5穴の平均 / 5% FBSのみを含む培地で培養した際の5穴の平均)  $\times$  100

図1に示した処理後1日目の結果では、可溶化CNTで処理した細胞は、その濃度にかかわらず、可溶化CNT未処理の細胞と同程度の細胞生存率を示した。

図2、3に示した処理後2日目および7日目の結果も同様に、可溶化CNTで処理した細胞は、

その濃度にかかわらず、可溶化CNT未処理の細胞と同程度の細胞生存率を示した。

## D. 考察

本研究ではカーボンナノチューブがHFの生育に与える影響を解析した。実験には古月らの方法により可溶化したカーボンナノチューブを用い、濃度範囲は2~0.008 ng/mlとした。その結果、HFは可溶化CNTの濃度に関わらず1、3、7日目まで、未処理のものと同様の生存率を示した。このことから、可溶化CNTはHFに対し、細胞増殖の促進および阻害のどちらにも影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、可溶化CNTを含まない可溶化溶媒についても、HFの生存率が未処理のものと同程度であったことから、増殖の促進および阻害のどちらにも影響しないといえる。

## E. 結論

MTS法を用いたHF生存率の測定結果より、可溶化CNTは細胞増殖促進能および細胞障害能のどちらにも有していないことが明らかとなった。

## 2. ANTI OXIDANT TEST によるカーボンナノチューブの活性酸素除去能の測定

### A. 研究目的

カーボンナノチューブと同様に炭素のみから構成されるフラーレンでは、その誘導体において高い活性酸素除去能が報告されている。本研究においては前述の可溶化したカーボンナノチューブ(可溶化CNT)および塩酸処理により精製されたカーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて、それぞれの活性酸素除去能を評価した。

## B. 研究方法

25  $\mu$ g/ml の可溶化 CNT を精製水によって希釈し、1、0.1、0.01、 $\mu$ g/ml に調製した。同様にカーボンナノチューブを可溶化する際に用いた溶媒についても、精製水によって 25、250、2500 倍希釈し、CNT 濃度 0.01、0.1、1  $\mu$ g/ml それぞれのバックグラウンドとした。

MWCNT を 10 mg 秤量し、100 ml の精製水に加えた。これを 15 分間超音波処理し、カーボンナノチューブを精製水中に分散した。また同様に精製水を 100 ml 分注し、15 分間超音波処理した。分散した MWCNT を超音波処理した精製水によって 10、 $10^3$ 、 $10^6$ 、 $10^9$ 、 $10^{12}$  倍に希釈した。

活性酸素除去能力は Knight Scientific Limited 社製の Abel antioxidant Kit を用いて測定し、サンプルおよび各種溶液は添付プロトコルの 5 分の 1 容量で行った。コントロールとして、サンプルの代わりに精製水および超音波処理した精製水を用いた。

Solution B 以外のすべての溶液を、ルミノメーター用チューブ内で混合し、それをルミノメーターにセットした。反応は、Solution B を加えピペッティングすることにより開始した。

発光度は 2 種類のルミノメーターを用いて測定した。LumitesterC -100(キッコーマン株式会社製)を用いた際には、反応開始後 0~10 秒間の積算値を測定し、記録した。

LumitesterC-1000(キッコーマン株式会社製)を用いた際には、反応開始後 0~25 秒までの発光を 1 秒ごとに記録した。

## C. 研究結果

Abel antioxidant Kit はコントロールの最大発光度に対する、サンプル添加時の最大発光度から、その発光減少率を求めることにより、サンプル

の活性酸素除去能を算出する。発光減少率は次式より求める。

$$\text{発光減少率(\%)} = \{1 - (\text{サンプル添加時の最大発光度} / \text{コントロールの最大発光度})\} \times 100$$

可溶化 CNT の発光度の測定結果を図 4 に示す。但し、発光度は前述の LumitesterC -100 によって測定し 0~10 秒までの積算による測定値を示した。その結果、可溶化 CNT 1  $\mu$ g/ml において最大の発光減少率を示し、その割合は 11%であったが、バックグラウンドである可溶化溶媒の 25 倍希釈では、14%の発光減少率であった。

超音波処理によって精製水中に分散させた MWCNT の発光度の測定結果を図 5 に示す。但し、発光度は前述の LumitesterC-1000 によって測定した。また、コントロールおよびサンプルが測定開始 1 秒後に最も高い値を示したことから、このときの値を示した。精製水を 15 分間超音波処理したものをコントロールの値とすると、MWCNT の発光度は全てそれよりも高い値を示しており、発光の減少は見られなかった。最も高い発光を示したのは、 $10^3$  倍希釈したもので、コントロールの 114%に値した。

## D. 考察

古月らの方法により分散したカーボンナノチューブでは、活性酸素除去能を示す発光減少率が濃度依存的に増加した。しかしながら、バックグラウンドとなるカーボンナノチューブ可溶化溶媒を、サンプルと同じ希釈倍率で希釈したものについても同様の傾向が見られた。これらのことより、可溶化 CNT で見られた発光減少は、CNT の活性酸素除去能を示すものではないと考えられる。

超音波処理により分散させた MWCNT では、コントロールよりも高い発光度を示した。コントロールの発光度に対し、減少が見られない場合は活性酸素の除去能を有していないことを示す。