

B

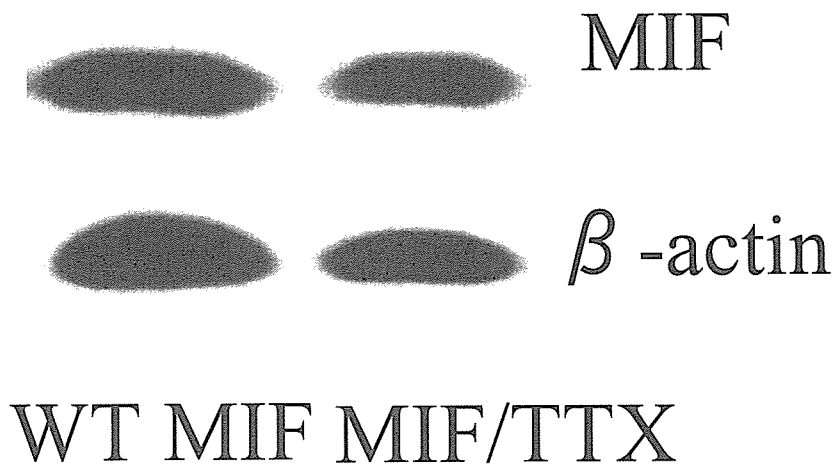


図1 MIF/DNA ワクチンのデザインと MIF/TTX タンパク質の抗原性. A. 野生型 MIF 立体構造に見られる 2 番目のループに Th エピトープとして知られる破傷風菌毒素 (TTX) 由来 P30 ペプチドを組み込む変異型 MIF/TTX をデザインした. この cDNA を pCAGGS に組み込み, MIF/DNA ワクチン (pMIF/TTX) を作成した. B. 野生型 pMIF および pMIF/TTX を COS-7 細胞に導入し, そのライセートをウエスタンブロット法にてウサギ抗マウス MIF 抗体を用いて解析した.

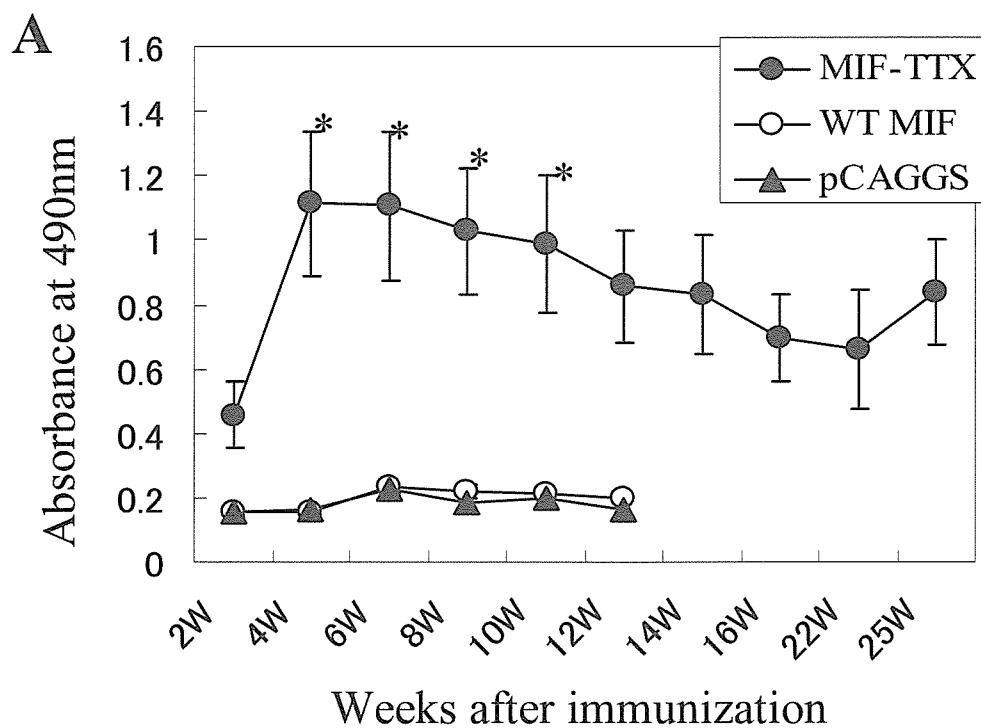


図 2 MIF/TTX ワクチンによる抗 MIF 抗体の誘導と TNF- α 産生抑制. (A)pMIF/TTX による免疫は野生型マウス MIF を認識する自己抗体を産生させる. Balb/c マウスを pCAGGS, 野生型 pMIF 発現ベクター, あるいは pMIF/TTX により免疫した. 尾静脈より少量の血液を採取し, リコンビナント MIF を固相化したプレートを用いた ELISA にて抗 MIF 抗体価を測定した. 結果は, 平均 \pm SE で示した (* p <0.05,pMIF/TTX 対 pCAGGS).

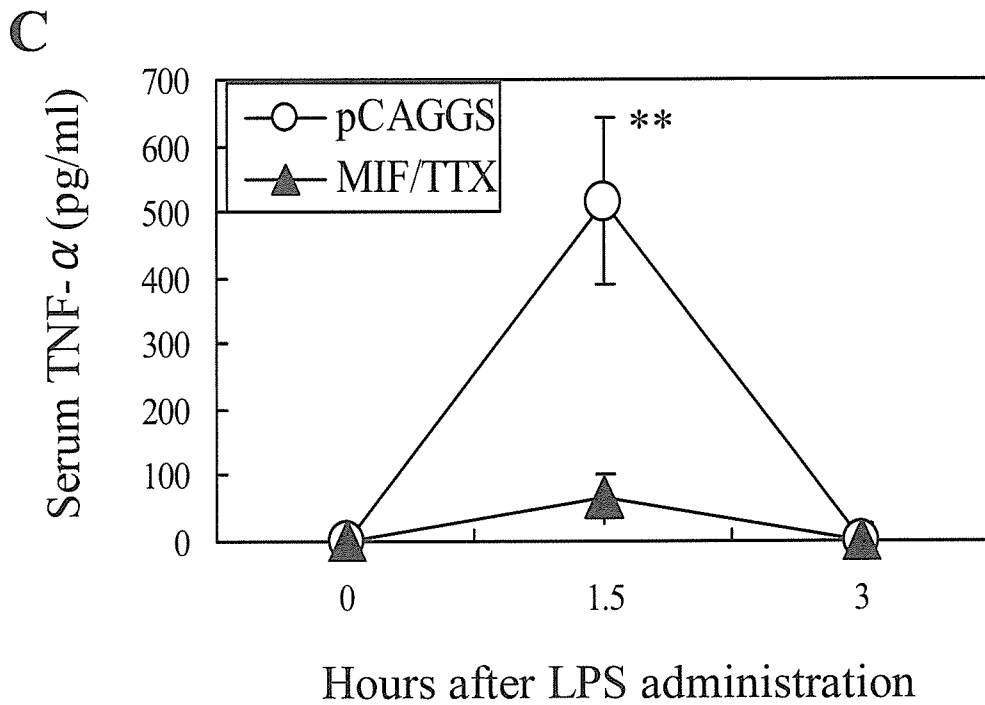


図 2 MIF/TTX ワクチンによる抗 MIF 抗体の誘導と TNF- α 産生抑制. (C) pMIF/TTX ワクチンは LPS で誘導される TNF- α の上昇を抑制する. pCAGGS もしくは pMIF/TTX 投与 6 週間後, Balb/c マウスに LPS と D-ガラクトサミンの混合物を静脈内投与し, 1.5 時間毎に尾静脈から血液を採取, TNF- α の血中濃度を ELISA 法で測定した (* $p < 0.05$).

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ナノコンポジットの体内挙動検索に関する研究
—合成炭酸アパタイトコンポジットのナノ物理化学的性状—

分担研究者 岡崎正之

広島大学医歯薬学総合研究科教授

研究要旨 生体材料への応用を目指したナノ炭酸アパタイト結晶の合成を行い、その物理化学的性状を X 線回折、FT-IR, SEM, HR-TEM, ICP 等を用いて分析した。化学分析の結果では、炭酸供給量の増加に伴い炭酸含有量は増加、反対に P はわずかに減少し、FT-IR の CO_3^{2-} に起因する吸収ピークは増大した。また X 線回折では(300)回折線が高角度側にシフトした。これらの結果を総合的に判断して炭酸イオンがアパタイトの結晶内の主として PO_4^{3-} の位置に置換していることが示唆された。炭酸アパタイトの結晶性は、炭酸含有量の増加に伴い低下し、結晶の形態も明瞭な六方晶形状から次第にその形態が維持されなくなった。炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジは細胞の侵入に十分な空隙を保持し、骨芽細胞様細胞は良好な接着性と侵入性を示した。これらの結果より、炭酸含有量の変化に応じて異なる結晶学的物性を示すことが明らかとなり、生体材料への応用に当たっては創製したナノアパタイトコンポジットが三次元培養や代謝性のコントロールに利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

1. 炭酸アパタイトの結晶学

ヒトの硬組織である歯や骨の無機成分は、ハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ と呼ばれる狭義のバイオセラミックスから成り立っている。この無機成分に加え歯質エナメル質では、非コラーゲン性タンパク質がわずかに含まれ、象牙質や骨では有機成分としてコラーゲンが30~40wt%含まれる。この歯質エナメル質と象牙質、骨を X 線回折してみると、非常に興味深いことに構成するアパタイトの結晶性がまったく異なる (図1)。エナメル質はきわめて結晶性が高いが、象牙質や骨の結晶性は低い。

アパタイトは、リン酸カルシウム的一种で、自然界には数多くの異なるアパタイトが存在し、歯や骨をつくるアパタイトがハイドロキシアパタイトであ

る。このハイドロキシアパタイトは、六方晶系のイオン結晶で、 $1/3$ が結晶ユニットになっている。実際の生体アパタイトは、この Ca^{2+} , PO_4^{3-} , OH^- の位置に微量の元素が種々置換し、さらに複雑な構造になっている。 CO_3^{2-} も PO_4^{3-} の位置に数%置換し、生体アパタイトは、炭酸アパタイトとも呼ばれている。

この炭酸アパタイトは、炭酸含有量によって物理化学的性状が大きく異なる。従って、炭酸アパタイトを利用した生体材料を生体内へ埋入する場合には、生体親和性も大きく左右されることが予想され、時として生体内リスクを伴うことも完全には否定できない。

2. 炭酸アパタイトのナノ性状

水溶液系で合成した場合、炭酸アパタイトは一般に合成温度が低くなると結晶性も悪くなり溶解性も

増加してくることが知られている。

ただ、炭酸アパタイトの生体材料への応用に当たっては、アパタイトの物理化学的性状並びに生物学的性状に及ぼす炭酸含有量の影響について、さらに詳細な検討が必要となる。

3. 炭酸アパタイトの生体材料への応用

組織工学による再生医療には、細胞やサイトカインに加えて、スカフォールドの存在は欠かせない。特に、細胞の3次元培養可能な多孔性のスカフォールド生体材料が期待されている。我々は、骨アパタイトに類似した結晶性と組成を有する炭酸アパタイトの合成を行い、得られた粉末結晶試料をコラーゲン溶液と混合し、凍結乾燥することによりスポンジ状スカフォールドの創製を確立している。また、ポーラスなアパタイト円筒状フレームを作成し、スポンジとハイブリッド化することにより、生体骨の緻密骨と海綿骨に類似した構造をもつ人工骨の創製も可能となっている(図2)。もしこへ血管新生因子や骨増殖因子のようなサイトカインを導入できれば、高機能性を有する生体模倣の人工骨の創製が可能となる。本研究では、その際の炭酸アパタイトの生体親和性と生体内安全性をナノレベルで評価できる解析手法を検討するとともに、さらには炭酸アパタイト複合体の最適化を検討して行く予定である。

本年度は、その基礎実験として行った炭酸アパタイトの性状に及ぼす炭酸含有量の影響に関する物理化学的検討並びに炭酸アパタイト・コラーゲンコンポジットの形態学的検討について報告する。

B. 研究方法

(i) アパタイトの合成

まず、ハイドロキシアパタイト[HAp]の合成は、1 Lの1.3 M 酢酸アンモニウム溶液[CH₃COONH₄]をヒーターにセットしたフラスコに入れ、0.5 Lの0.2 M 酢酸カルシウム[Ca(CH₃COO)₂・H₂O]と、0.5 Lの0.12 M リン酸アンモニウム[NH₄H₂PO₄]を、200ml/hで約2.5時間かけてフラスコに滴下した。モーターは300 rpmにセットし、ヒーターを60°Cに保ち、水酸化ア

ンモニウム[NH₄OH]を使ってpH 7.4に保ちながら3時間攪拌した。ピーカーに移し一晩放置して、ろ過・水洗し、60°Cで1週間乾燥させ質量を測定した。炭酸アパタイト[CO₃Ap]の合成は、0.12M リン酸アンモニウムに0.3 M, 0.06 M, 0.03 M, 0.01 M, 0.005 Mの炭酸アンモニウム[(NH₄)₂CO₃]を添加したものをを用いた。

(ii) X線回折による結晶性の評価

X線回折装置(島津 DX1)を用いてHApとCO₃Apを測定した。測定フォルダーに試料を圧接して装置にセット後、4°~40°および32.0°~34.0°の角度範囲で測定した。

(iii) FT-IRによる測定

FT-IR(島津FT-IR 8400S)を用いて、HApとCO₃ApのIR吸光度スペクトルを500~4000カイザーの範囲で測定した。1.0 mgの試料と100 mgのKBrを混合し、乳鉢ですりつぶした粉末を拡散反射法で測定した。

(iv) 粉末の形態観察

走査型電子顕微鏡(SEM: 日立 S-4300)を用いて、HApとCO₃Apの形態を観察した。試料は、導電性テープを貼った試料台に固定後、イオンスパッター装置を用いてプラチナ蒸着を施し、5000倍と20000倍の倍率で観察した。また、高解像度透過型電子顕微鏡(HR-TEM: Topcon EM002B)を用いて、約60μmの薄片試料の結晶断面形状を観察した。

(v) CO₃Ap-コラーゲンスポンジ作製

3.2 mLの0.1M水酸化ナトリウム[NaOH]と40 mLのコラーゲンを混合しゲル化させた。その中に468 mgのCO₃Apを混合し、96 wellのディッシュに360 μLずつ入れて、-80°Cで2時間凍結し、その後-50°Cで3日間凍結乾燥した。試料をμCT(SKYSCAN 1072)にてスキャンしコンピュータにて3D形状を構築した。

(vi) スポンジ上での細胞培養

スポンジを片面2時間ずつ、計4時間ほど紫外線照射して不溶・殺菌処理を施した。このスポンジに骨芽細胞様細胞を2.5 x 10⁵ cell/wellずつまき、1週

間培養した。

C. 研究結果

(i) 化学分析およびX線回折

各合成試料の化学分析の結果を表1に示す。炭酸供給量の増加に伴い炭酸含有量は増加し、P含有量が低下しているのがわかる。各試料のX線回折パターンはアパタイトックパターンを示し、炭酸濃度が高くなるほど結晶性は低下した(図3)。また、拡大した $32.0^{\circ}\sim 32.3^{\circ}$ および $32.6^{\circ}\sim 33.0^{\circ}$ 付近に認められた(300)回折線ピークは、炭酸濃度の増加に伴い高角度側にシフトした(図4)。

(ii) FT-IRによる測定

1400 ~ 1500 cm^{-1} での吸収ピークは炭酸の存在を示しており、炭酸の濃度が増加するにつれて吸光度も増加した(図5)。

(iii) SEMでの形態観察

HApの形態は明瞭な針状結晶示していた(図6)。0.005Mの形態は板状結晶になっており、板状が重なって合っていた。0.06Mの形態は板状が小さくなった。0.3Mの形態はブロッコリー状になっており、細かく小さな針状の固まりのようであった。HR-TEM観察では、HApの場合明瞭な六角形の結晶断面構造が観察されたが、炭酸含有量の増加に伴い結晶の六角形形態は維持されなくなった(図7)。

(iv) 細胞培養

炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジは、細胞の侵入に十分な適度の空隙率を保持していることが μCT の観察から明らかとなった(図8)。骨芽細胞様細胞はスポンジ表面上に突起を伸ばし良好な接着性を示した(図9)。また、スポンジ内部まで侵入していた。

D. 考察

本研究で水溶液系にて合成した炭酸アパタイトは、炭酸イオンがアパタイト結晶内に取り込まれるにつ

れX線回折パターンの(300)回折線は高角度側にシフトし、a軸の格子定数が減少した。SEM観察では、一般に、 80°C で合成された結晶性の良いハイドロキシアパタイトは大きな六方晶の板状結晶を示すが、炭酸イオンが増加してくるにつれ次第に丸みを帯び、合成温度が 60°C と低くなると結晶もフレーク状から小さな結晶が凝集したような像を呈するようになる。HR-TEMによるナノレベルでの観察においても、炭酸イオン含有量が増大すると最早六方晶の断面構造は示さなくなり多くの格子欠陥が認められるようになる。本研究のSEM, HR-TEM観察においても、これらの報告を支持する所見が得られた。

X線回折にてピークが高角度側にシフトし、結晶格子が小さくなったことが示唆されが、このことは PO_4^{3-} の大きさと CO_3^{2-} の大きさを比較すると PO_4^{3-} のイオン半径が大きいので、 PO_4^{3-} が CO_3^{2-} に置換されると結晶格子の大きさが小さくなったためと考えられる。 CO_3Ap の結晶は CO_3/P 供給比が1.0付近で骨に近い結晶性を示した。この CO_3Ap を用いて作成した CO_3Ap -コラーゲンスポンジは細胞のなじみが良好で、スポンジ内部にも侵入し、三次元培養の可能性が示唆された。

E. 結論

本研究で試作した CO_3Ap -コラーゲンスポンジは、骨再生用スカフォールド生体材料として有望であり、特に歯槽骨の再建・再生への応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokota R., Hayashi H., Hirata I., Miake Y., Yanagisawa T. and Okazaki M.: Detailed consideration of physicochemical properties of CO₃apatites as biomaterials in relation to carbonate content using ICP, X-ray diffraction, FT-IR, SEM and HR-TEM. Dent Mater J 25: 597-603, 2006.

2. 学会発表

1. 横田理絵、林英貴、平田伊佐雄、岡崎正之、“生体骨類似炭酸アパタイトコラーゲンスカフォールドの創製”平成18年6月10日、広島大学歯学会総会、広島.
2. 林英貴、横田理絵、平田伊佐雄、岡崎正之、“生体材料への応用を目指した炭酸アパタイトの結晶学的性状”平成18年8月26日、日本歯科理工学会近畿・中四国支部夏期セミナー、四条畷.
3. 岡崎正之、“硬組織バイオマテリアルの現状と将来展望”平成18年9月16日、化学工学会第38回秋季大会シンポジウム<バイオメディカルマテリアルの最前線>「展望講演」、福岡.

G. 知的所有権の取得状況

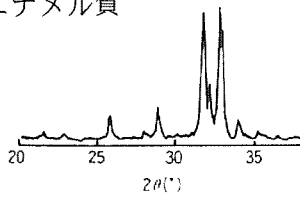
1. 特許取得

無し

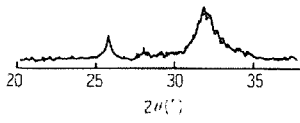
2. 実用新案取得

無し

エナメル質



象牙質



骨

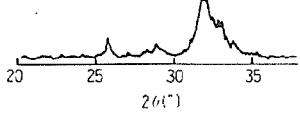


図1 歯と骨の X線回折パターン

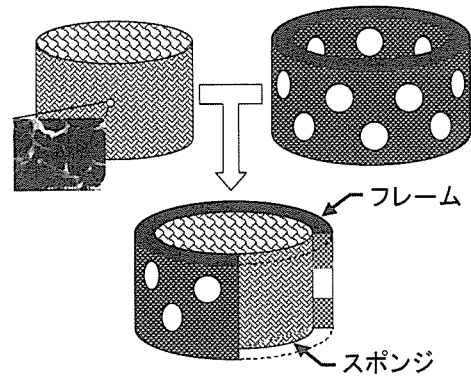


図2 フレーム強化炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールド

表1 合成炭酸アパタイトの化学組成

Samples	Ca (mmol/g)	P (mmol/g)	CO ₃ (mmol/g)
HAp	9.01±0.09	5.74±0.09	-
CO ₃ Ap _{0.005}	8.45±0.09	5.48±0.07	0.12±0.05
CO ₃ Ap _{0.01}	8.49±0.19	5.62±0.12	0.21±0.09
CO ₃ Ap _{0.03}	8.72±0.09	5.50±0.11	0.58±0.06
CO ₃ Ap _{0.06}	8.78±0.16	5.46±0.15	0.80±0.07
CO ₃ Ap _{0.3}	8.56±0.12	4.69±0.11	1.57±0.03

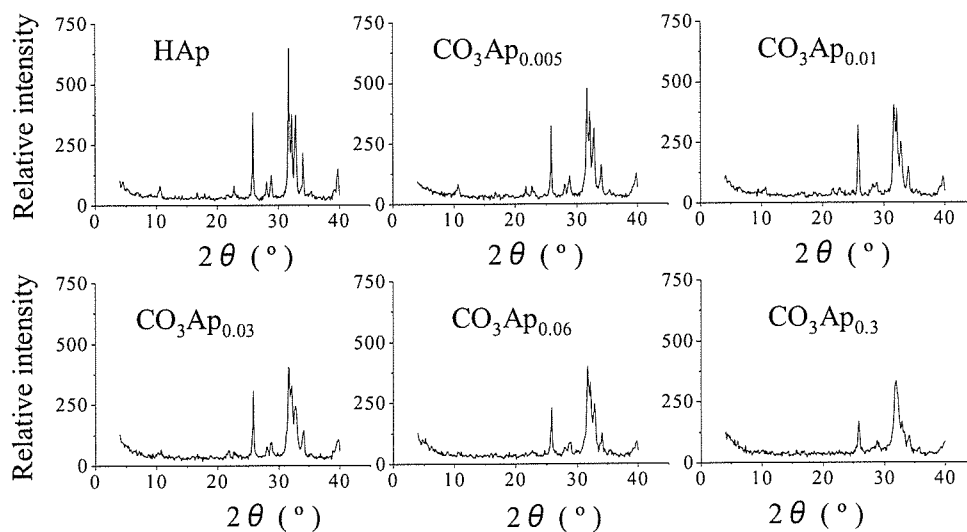


図3 炭酸アパタイトの X線回折パターン

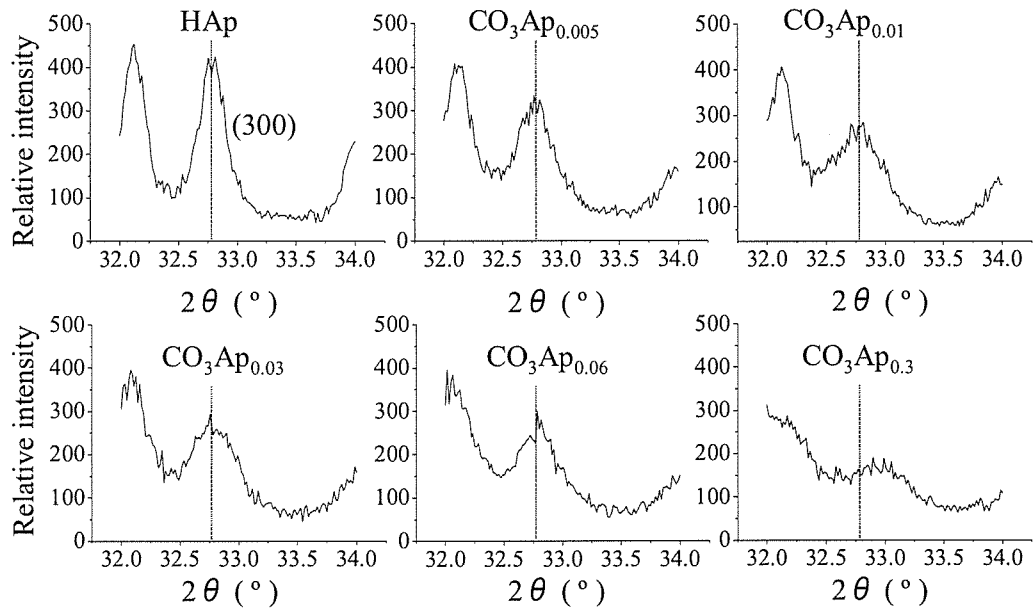


図4 炭酸アパタイトの拡大X線(300)回折線

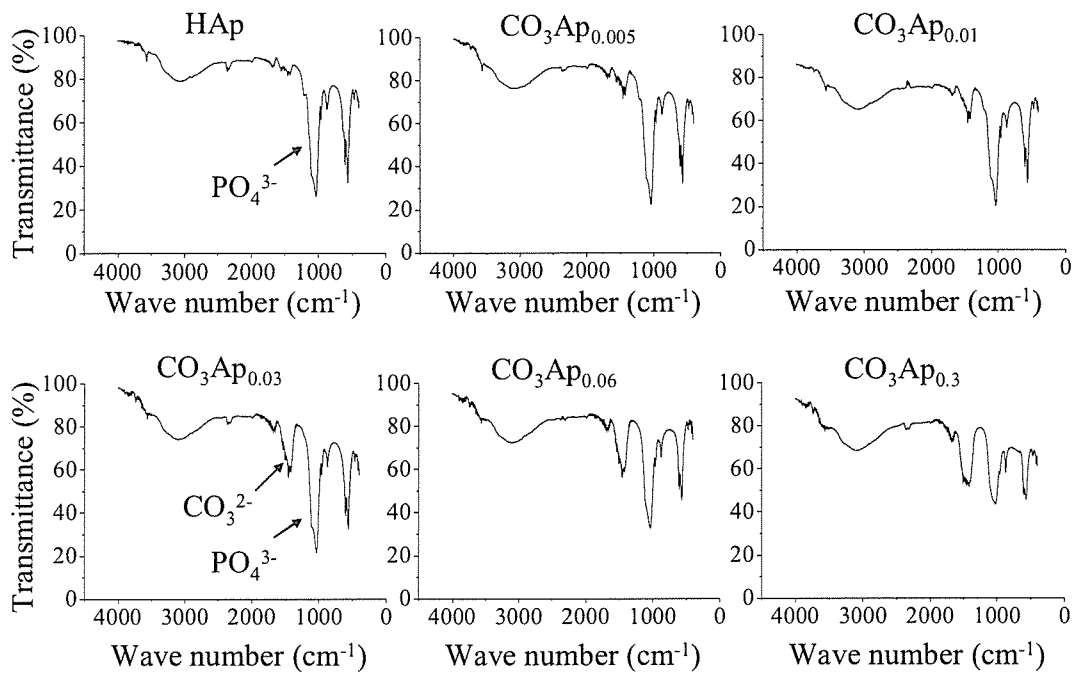


図5 炭酸アパタイトのFT-IR スペクトル

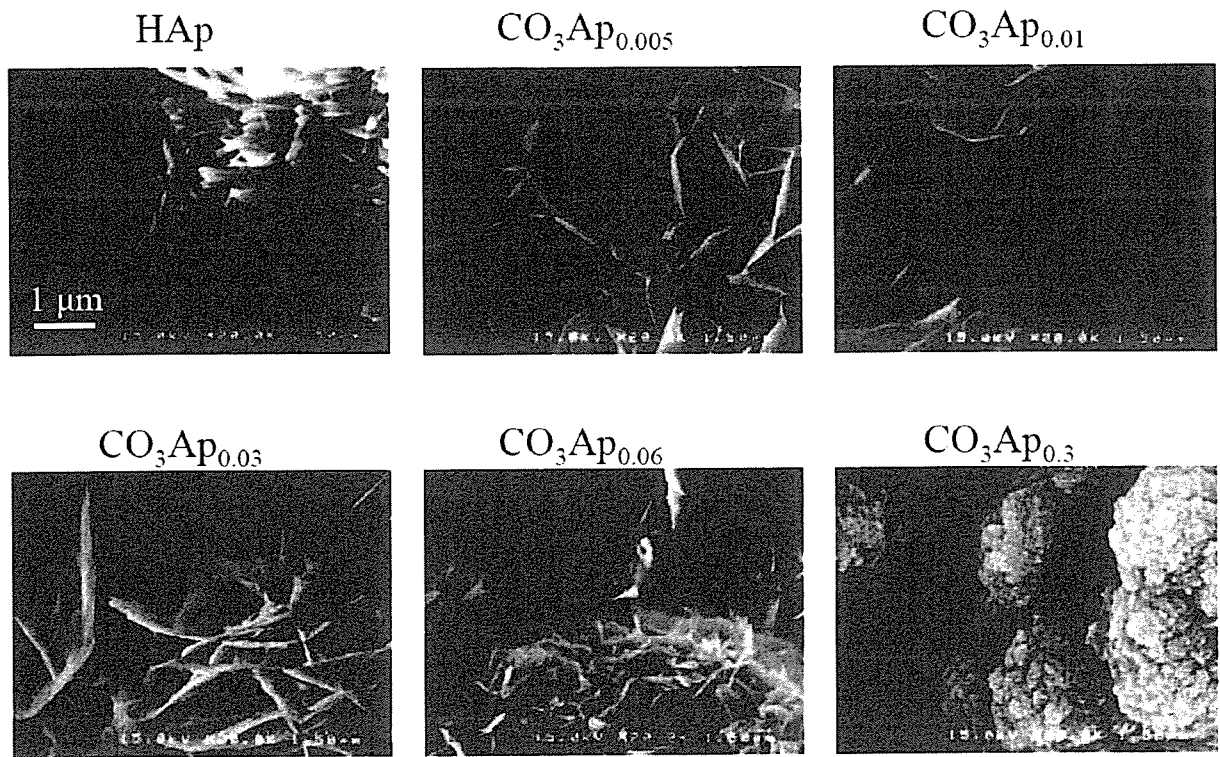


図6 炭酸アパタイトのSEM写真

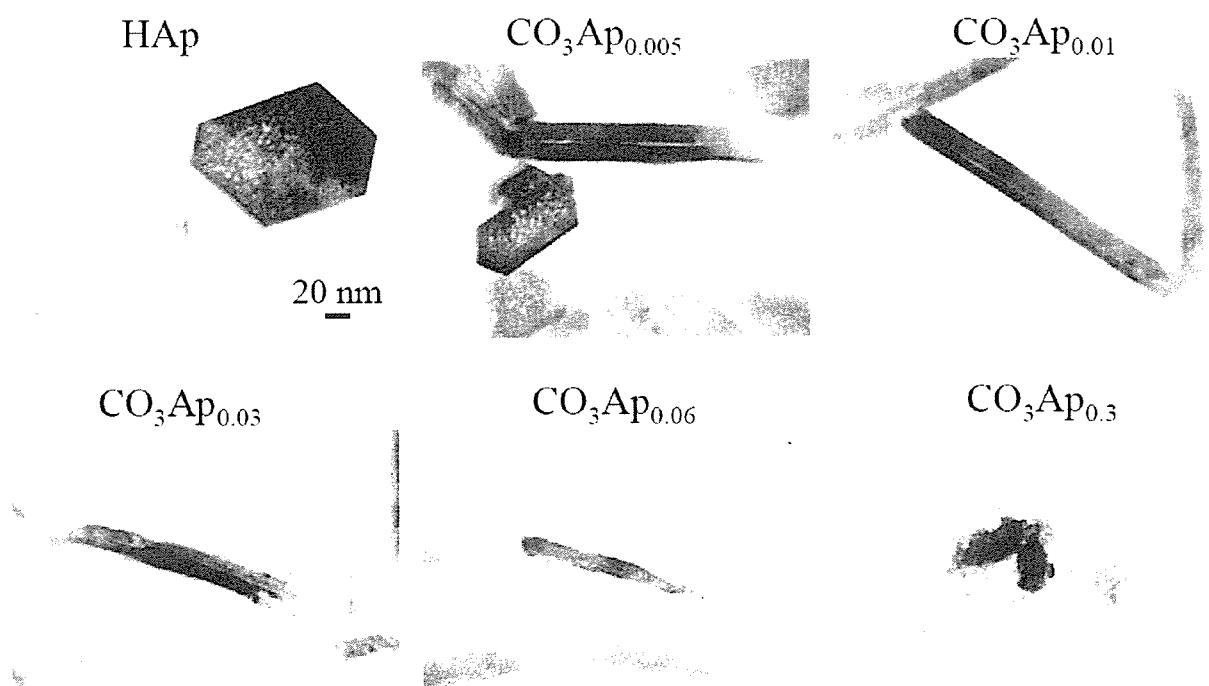


図7 炭酸アパタイトの断面HR-TEM写真

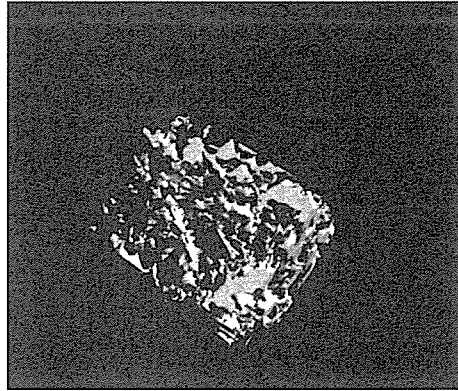


図8 炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジの μ CT像

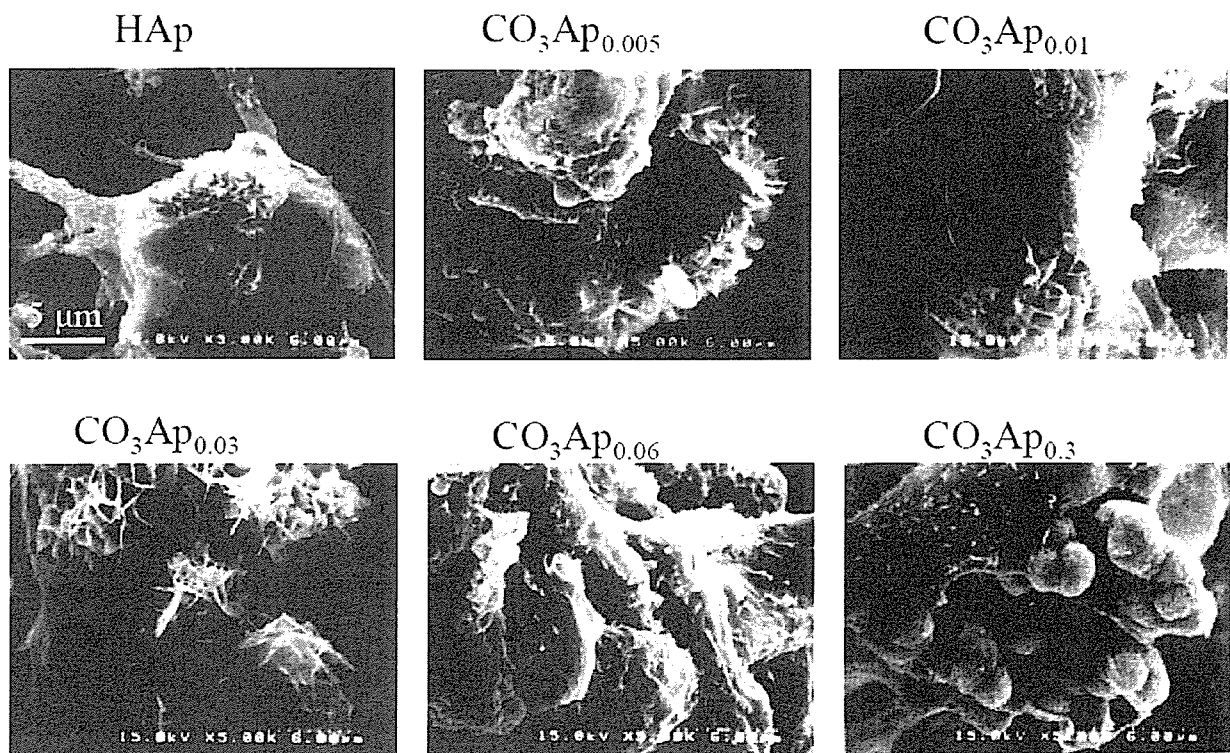


図9 炭酸アパタイト・コラーゲン上の骨芽細胞様細胞 SEM 写真

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

カーボンナノチューブによる揮発性有機化合物（VOCs）の吸着除去に関する研究

分担研究者 古月文志 北海道大学大学院地球環境科学研究院教授

研究要旨 カーボンナノチューブによる揮発性有機化合物（VOCs）の吸着・除去について検討した。23種類のVOCs（1,1-ジクロロエチレン、ジクロロメタン、トランス-1,2-ジクロロエチレン、シス-1,2-ジクロロエチレン、クロロホルム、1,1,1-トリクロロエタン、四塩化炭素、ベンゼン、1,2-ジクロロエタン、トリクロロエチレン、1,2-ジクロロプロパン、ブロモジクロロメタン、シス-1,3-ジクロロプロペン、トルエン、トランス-1,3-ジクロロプロペン、1,1,2-トリクロロエタン、テトラクロロエチレン、ジブロモメタン、m,p-キシレン、o-キシレン、ブロモホルム、1,4-ジクロロベンゼン）を含む標準気体サンプルを、カーボンナノチューブで充填されたカートリッジを通過させた後、GC-MSを用い、カーボンナノチューブに捕捉されたVOCsを定量的に測定した。その結果、1,4-ジクロロベンゼン、o-キシレン、m,p-キシレン、トルエンおよびベンゼン、即ち、芳香性VOCsは優先的に吸着・除去されることがわかった。福井フロンティア軌道理論に基づき、これらのVOCsのLUMOおよびHOMOのポテンシャルを計算したところ、カーボンナノチューブへの吸着は、それぞれの化合物のLUMOおよびHOMOのポテンシャルと密接に関連することがわかった。

A. 研究目的

現在地球上には温暖化、オゾン層の破壊、酸性雨、汚染物質の拡散など多くの環境問題がクローズアップされている。これらの問題を解決するための省エネルギー技術、または、クリーンエネルギーを作り出す技術、並びに、環境にやさしい商品や新素材を作り出す技術、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、既に有害物質に汚染されてしまった環境を元の姿に戻す技術、いわゆる「環境修復技術」の研究も積極的に進められている。有害物質は多様であり、その濃度も高濃度から低濃度まで様々である。特に、VOCsなどのような物質は、極低濃度・少量でも生態系や人間の健康に悪影響を与えるため、低濃度汚染物質に対応した特殊な捕集・除去技術の開発が必要となっている。また、汚染された環境には有害物質の他にさまざまな物質、

そして有害物質よりもはるかに高濃度の共存物質が含まれており、これらの物質の中から有害物質だけを選択的に除去することは極めて困難なことである。これまでに多くの有害物質を除去・処理する技術が開発されているが、それらの多くは、高濃度の有害物質を対象としたものであり、低濃度の有害物質の処理に適用するには非効率的である。そこで、複雑な環境の中から選択的に有害物質を捕集・濃縮し、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吸着剤として使われている。例えば、活性炭や木炭などは色素や匂い物質、重金属イオンから高分子まで、あらゆるものの吸着・除去に適用されている。一方、このことは逆に、選択性の欠如を示しており、実際の環境の中で低濃度有害物質の捕集・濃縮に活性炭や木炭などを用いようと

すると、共存する他の多くの物質によって吸着サイトはすぐに埋まってしまう。複雑な環境の中から、有害物質だけを選択的に捕集・除去することのできる新しい吸着材料の開発は、「環境修復」分野においては、当面、最大な研究課題となっている。我々の研究グループは、カーボンナノチューブの構造特性に着目し、高い選択性及び除去力を持つ吸着材料の開発に挑戦している。カーボンナノチューブの表面構造は、カーボンファイバーや活性炭の表面構造と本質的に異なり、蜂の巣状の規則正しい六員環ネットワークで形成されているので、芳香環を有する有機物質と強く結合する性質を持っている。そこで、シックハウス症候群の原因物質とも言われる揮発性有機化合物 (VOCs) の除去について、カーボンナノチューブを吸着剤として用いて、検討した。

B. 研究方法

23種類のVOCs (1, 1-ジクロロエチレン、ジクロロメタン、トランス-1, 2-ジクロロエチレン、シス-1, 2-ジクロロエチレン、クロロホルム、1, 1, 1-トリクロロエタン、四塩化炭素、ベンゼン、1, 2-ジクロロエタン、トリクロロエチレン、1, 2-ジクロロプロパン、ブromoジクロロメタン、シス-1, 3-ジクロロプロペン、トルエン、トランス-1, 3-ジクロロプロペン、1, 1, 2-トリクロロエタン、テトラクロロエチレン、ジブromクロロメタン、*m*, *p*-キシレン、*o*-キシレン、ブromoホルム、1, 4-ジクロロベンゼン) を含む標準サンプル (気体) 10リットルを、カーボンナノチューブを充填したカートリッジを1リットル/分の流速で通過させた後、カーボンナノチューブによる捕捉されたVOCsをGC-MSを用いて定量的に測定した。また、福井氏のフロンティア軌道理論に基づき、VOCsのLUMOおよびHOMOのポテンシャルを計算し、カーボンナノチューブとの相互作用について電子レベルから検討した。実験に用いたカーボンナノチューブはナノカーボンテクノロジー株式会社から購入したものであり、その基本物性に関する情報は表1に示す。

C. 研究結果

23種類のVOCs (1, 1-ジクロロエチレン、ジクロロメタン、トランス-1, 2-ジクロロエチレン、シス-1, 2-ジクロロエチレン、クロロホルム、1, 1, 1-トリ

クロロエタン、四塩化炭素、ベンゼン、1, 2-ジクロロエタン、トリクロロエチレン、1, 2-ジクロロプロパン、ブromoジクロロメタン、シス-1, 3-ジクロロプロペン、トルエン、トランス-1, 3-ジクロロプロペン、1, 1, 2-トリクロロエタン、テトラクロロエチレン、ジブromクロロメタン、*m*, *p*-キシレン、*o*-キシレン、ブromoホルム、1, 4-ジクロロベンゼン) を同時に含むモデルサンプルを、カーボンナノチューブを充填したカートリッジを通過させた後、カーボンナノチューブに捕捉・除去された成分を、CS₂で溶出し、その定量分析をGC-MSで行った。図-1は、各々のVOCsに対する吸着量を、カーボンナノチューブ1グラム当りに換算した後、棒状グラフで表した結果を示す。*p*-dichlorobenzene に対しての吸着量が最も高く、その値が796.8 µg/gであった。その次は *o*-xylene、*m*-, *p*-xylene、toluene の順であり、其々の値が386.4、351.2、113.6 µg/gであった。ベンゼンに対する吸着量はやや低く、その値は57.6 µg/gであった。一方、非芳香族VOCsに対しては、全体的には吸着量が低く、最も高い値 (1, 1-ジクロロエチレンに対しての吸着量) でも68.8 µg/gであった。これらの実験結果から、カーボンナノチューブは芳香族VOCsに対して選択的に捕捉・除去する能力を持っていることが言える。

D. 考察

カーボンナノチューブの表面構造は、活性炭の表面構造と本質的に異なり、蜂の巣状の規則正しい六員環ネットワークで形成されている。このため、1, 4-ジクロロベンゼン、*m*, *p*-キシレン、*o*-キシレン、トルエン、ベンゼンのような芳香族VOCsと強く結合する性質を持っている。カーボンナノチューブの吸着場としてのこのような特異的な効果については、「π電子移動説」で説明することができる。カーボンナノチューブにおいては炭素原子どうしが互いにsp²混成軌道によって結ばれている。残されている2p_z電子は、チューブ全体にわたるπ分子軌道によって収容されている。これらのπ電子はカーボンナノチューブの最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital, HOMO) π電子に相当し、エネルギー準位が高いため、他の物質の最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) に移り住む傾向がある。一方、受け入れ側の物質のHOMO π電子

は、カーボンナノチューブの π 電子の移り住みを阻止する働きをする。その結果、実際に移り住む可能な物質としては、低いLUMOと低いHOMOを持つ物質に限られている。言い換えれば、低いLUMOと低いHOMOを持つ物質ほどがカーボンナノチューブに選択的に吸着されることになる。例えば、福井氏のフロンティア軌道理論に基づき、これらの物質のLUMOおよびHOMOのポテンシャルを計算すると、*p*-dichlorobenzene の場合は、 -0.2430 および -9.2350 、*o*-xylene は 0.3902 および -9.2865 、*p*-xylene は 0.3564 および -9.1816 、*m*-xylene は 0.3914 および -9.3064 、benzene は 0.3961 および -9.7513 、toluene は 0.3762 および -9.4425 であることがわかる。これらの物質の中で、*p*-dichlorobenzene は最も低いLUMOおよび最も低いHOMOを持つため、カーボンナノチューブの π 電子を最も受け入れ易くとなる。その結果、他の物質と比べ、*p*-dichlorobenzene が最も優先的にカーボンナノチューブに吸着されることになる。

一方、吸着過程における温度の影響について調べた結果、吸着量は温度に殆ど依存しないことがわかった(図-2)。この結果から見ても、カーボンナノチューブによる芳香族性 VOCs の吸着は単純な物理的な吸着ではないことが言える。

活性炭を吸着剤として用い、同様な実験を行った結果、23 週類の VOCs に対して、選択性および吸着量には顕著な差が見られなかった。

E. 結論

カーボンナノチューブは芳香族 VOCs と強く結合する性質を持っている。LUMO および HOMO のポテンシャル、更に LUMO および HOMO の軌道の形状を情報源として用いて、カーボンナノチューブによる化学物質の吸着状況を予測することができる。この特異的な選択性を生かし、カーボンナノチューブを「吸着場」とする吸着材料を開発することにより、特定した有害物質を選択的に捕捉・除去する技術を確立することができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Z. Zhu, Y. Zhou, H. Yu, T. Nomura, B. Fugetsu,

Photo-degradation of humic substances on MWカーボンナノチューブ/nanotubular-TiO₂ composites, Chem. Lett., 35, 890 (2006).

2. 学会発表

1. 曾根弘明, 古月文志, "カーボンナノチューブを用いた有機物吸着剤の試作と評価", 第15回環境化学討論会, 2006, 6 (仙台) p156.
2. 曾根弘明, 古月文志, "Carbon Nanotubes as Adsorbents for Affinity-Based Elimination of Volatile Organic Compounds", 北海道大学国際シンポジウム「持続可能な開発」2006, 12 (札幌) p21.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案取得
なし

表1 吸着実験に用いたカーボンナノチューブの基本物性

Items	Properties
<i>d</i> (002) (nm)	0.3385
Lc (nm)	13
Diameter (nm)	40-90
Aspect ratio	> 100
Bulk density (g/cm ³)	0.005
Real density (g/cm ³)	2.1
Specific Surface area (BET) (m ² /g)	28
Burning temperature	600
Metal impurity	< 450 ppm

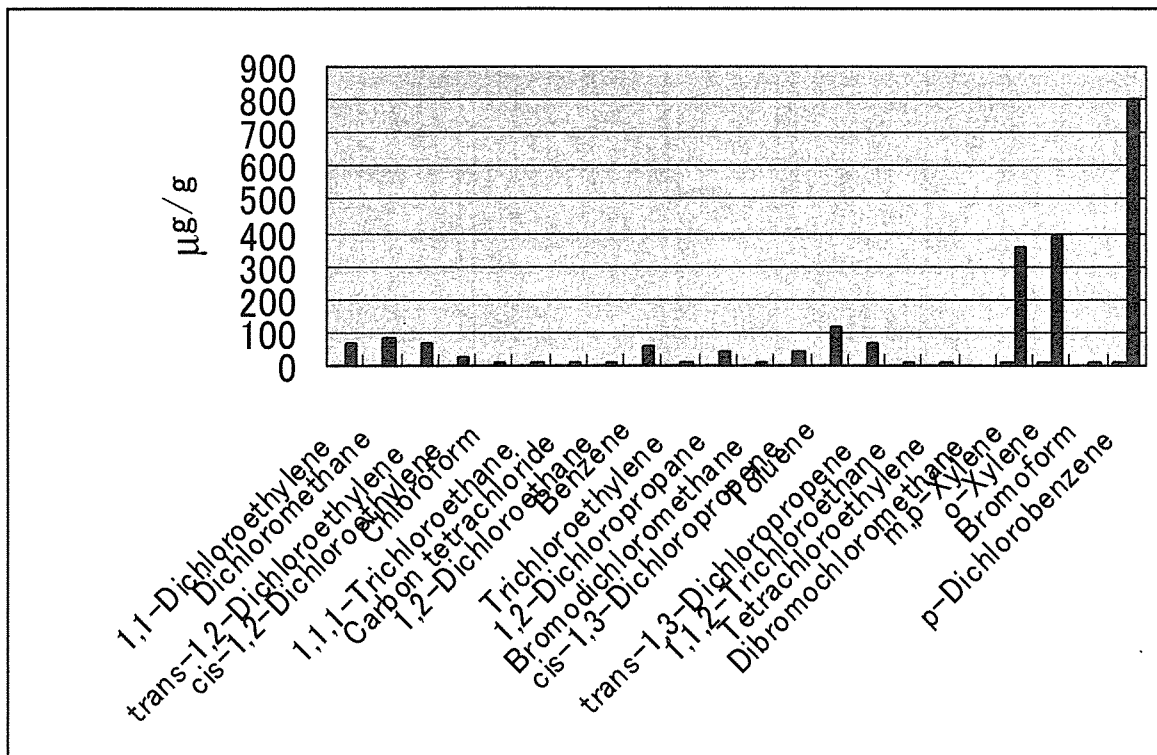


図1 カーボンナノチューブグラム当たりの吸着量

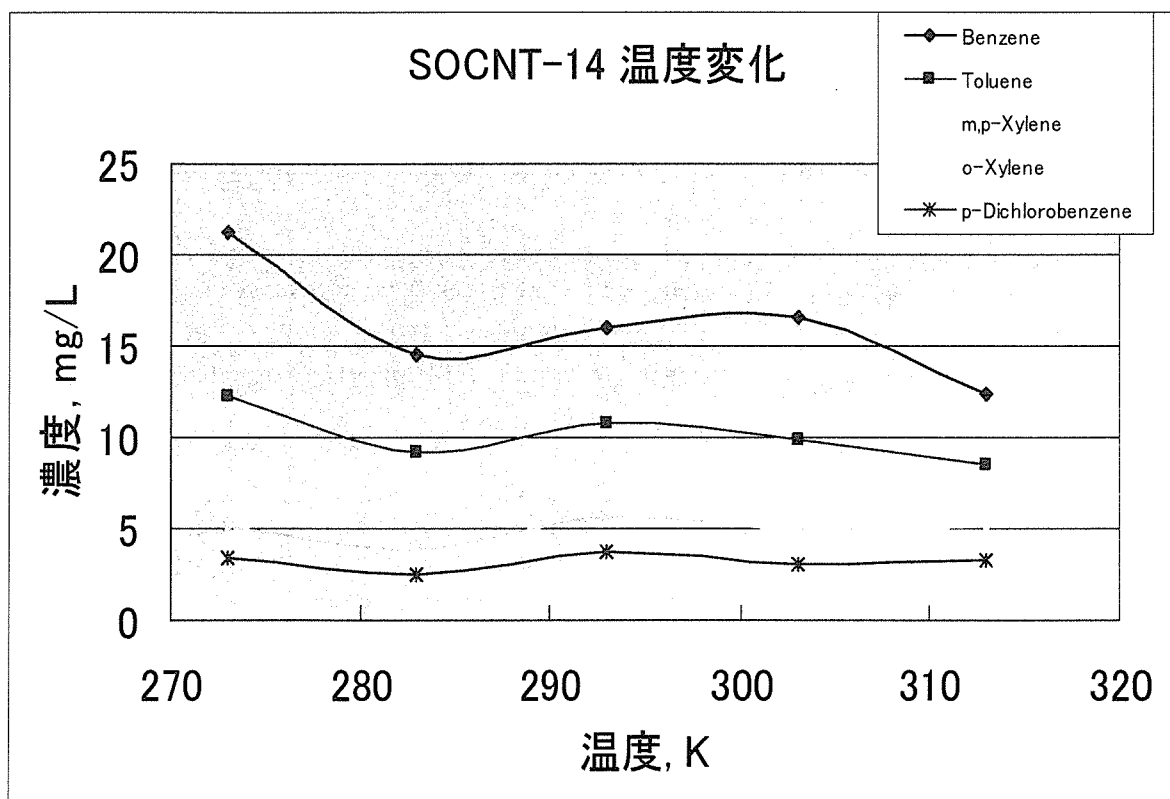


図-2 VOCs の吸着における温度の影響

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

BN ナノチューブおよびアスベスト類の細胞毒性評価と
BN ナノチューブの口腔内細菌吸着への応用に関する研究

分担研究者 森田 学 北海道大学歯学研究科教授
研究協力者 宇尾基弘 北海道大学歯学研究科助教授
研究協力者 赤坂 司 北海道大学歯学研究科助手

研究要旨 本研究においては、BN ナノチューブ及びアスベスト 3 種の細胞毒性試験を行い、いずれの試料も粒子濃度の増加に伴って細胞活性が低下、即ち毒性が増加する傾向が見られた。特に 10ppm 以上で活性の低下が見られ、これは微粒子が凝集・沈殿して細胞増殖を物理的に阻害したためと考えられた。微粒子間の細胞毒性には有意な差は見られなかった。これは本実験で示されている微粒子の毒性が化学的組成に依存せず、物理的な特性によるためと考えられた。

また BN ナノチューブと口腔内細菌 {*Streptococcus mutans* (S.mutans)} の吸着特性を検討したところ、S.mutans と BN ナノチューブが高効率で吸着することが判明した。これは BN ナノチューブの微細な構造およびタンパク質に対する強固な吸着特性により、効率的な細菌吸着を示すためと考えられ、BN ナノチューブは細菌吸着剤としてのバイオ応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

アスベスト類は天然の繊維状鉱物であり、ナノメートルレベルの直径とミクロンレベルの長さを持つ針状結晶である。アスベスト類は耐熱・耐化学性に優れていることから、シール材や耐熱材、建材などに広く用いられてきたが、近年ではその吸入毒性が問題となっており、使用が禁止されている。このような用途では代替材料の開発が行われているが、未だにアスベストを凌ぐ材料が得られていない用途もある。

他方、カーボンナノチューブの発見以降、カーボン以外のナノチューブも開発されており、窒化ホウ素 (BN) のナノチューブも得られている。BN は加工工具などにも用いられる強度と耐化学性に優れた材質であり、BN ナノチューブ (以下、BN-NTs) は新たな材料への応用が期待されている。

図 1 は BN-NTs 及びアスベスト類の光学像と SEM 像を示している。アスベスト類は直径が 1 μ m 弱なのに対し、BN-NTs は数十 nm と直径が細いが、針状の

形態は類似していることが分かる。

そこで本研究ではアスベスト類および BN-NTs の細胞毒性を評価すると共に、BN-NTs の生体への応用として口腔内細菌との親和性を調査し、細菌除去の可能性を検討した。

B. 研究方法

(1) BN-NTs 及びアスベスト類の細胞毒性評価

細胞数が 10⁴個/ml となるように培地(α -MEM + 10% FBS)に分散し、24 穴ウェル中に 1ml ずつ滴下した。(使用細胞：ラット繊維芽細胞様細胞 MC3T3-E1) 細胞静着後に BN-NTs、カーボンナノチューブ(MWCNTs)材料の分散液を 250 μ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で 1~3 日間培養した。

細胞活性の評価には、比色定量試薬 Alamar blue (Biosource, CA, USA) を使用した。培養後の各ウェルを洗浄し、浮遊ナノ微粒子を除去した後、10% Alamar Blue 溶液を滴下・37 $^{\circ}$ Cで培養し、色素の変化を比色法により定量評価し、細胞活性の指標とした。

また培養後の細胞を洗浄後、ギムザ染色を行い光学顕微鏡下で形態観察と細胞数のカウントを行った。

(2) BN ナノチューブの口腔内細菌吸着特性

BN-NTs への口腔内細菌 {*Streptococcus mutans* (*S.mutans*)} の吸着特性を評価するため、*S.mutans* 懸濁液と BN ナノチューブを混合・攪拌後、BN ナノチューブ凝集体を沈殿させ、浮遊している菌の濃度を吸光度から評価した。比較のためカーボンナノチューブ類の吸着特性も評価した。

C. 研究結果

(1) BN-NTs 及びアスベスト類の細胞毒性評価

24~72 時間培養後の粒子濃度と細胞活性 (粒子のない場合=Control を 100%とした) の関係と、24 時間と 72 時間培養後の生存細胞数 (光学顕微鏡観察による実数カウント) の結果を図 2-1 及び図 2-2 に示す。粒子濃度の増大と共に細胞活性が低下している。特に 10ppm 以上での活性低下が著しいが、これは 10ppm 以上では培養液中で添加粒子が容易に凝集・沈殿し、培養容器内での細胞の生育を物理的に阻害するためと考えられる。

左図は 72 時間培養後の生存細胞数の実数を光学顕微鏡下でカウントした結果であり、細胞数も活性と同様に粒子濃度の上昇と共に減少する傾向がある。細胞活性、細胞数とも粒子の種類による顕著な差は認められない。

図3は48時間培養後の細胞の光学顕微鏡写真であり、BN やアスベスト類が細胞周囲に付着しているようすが観察される。

(2) BN ナノチューブの口腔内細菌吸着特性

BN ナノチューブへの口腔内細菌 {*Streptococcus mutans* (*S.mutans*)} の吸着特性を検討した。*S.mutans* と BN ナノチューブを攪拌後、BN ナノチューブ凝集体を沈殿させ、浮遊している菌の濃度から吸着特性を評価した。その結果 (図 4) より、BN ナノチューブは単層・多層カーボンナノチューブとほぼ同様に上澄み液の吸光度を減少させた。このことより BN ナノチューブは、カーボンナノチューブと同様に強い細菌吸着特性を示すことが明らかとなった。

さらに *S.mutans* 吸着後の BN ナノチューブを

SEM により観察した結果、右写真のように細菌と BN ナノチューブは複雑に混ざり凝集している様子が観察された。詳細に観察すると、BN ナノチューブへ細菌が産出した菌体外多糖が絡まるように吸着している形態および菌体自体が表面へ吸着している形態が見られた。これらの結果より、BN ナノチューブの微細な構造およびタンパク質に対する強固な吸着特性により、効率的な細菌吸着を示すものと考えられる。以上より、BN ナノチューブは細菌吸着剤としてのバイオ応用の可能性が示唆された。

また BN ナノチューブ添加培地における *S.mutans* 培養から細菌への為害性を評価したところ、*S.mutans* の増殖に BN ナノチューブの影響はなく、細菌を死滅させるような毒性は示さないことが分かり、短期的ではあるが比較的良好な生体適合性を示すと推測された。

D. 考察

・BN ナノチューブ及び比較のため多層 CNT とアスベスト 3 種の試験を行ったが、細胞活性測定に於いては、いずれの試料も粒子濃度の増加に伴って細胞活性が低下、即ち毒性が増加する傾向が見られた。今回試験したナノ微粒子は光学顕微鏡写真からも分かる通り、ウェル (培養容器) 底面に沈殿して、同じく底面に付着して生育する細胞に接触あるいは物理的な障害となって増殖を阻害することが推測される。従って細胞活性 (=細胞数) の低下は主としてこれら物理的な現象によるものと推測される。

・BN ナノチューブにおいて、1ppm を境に細胞活性がやや急に上昇するようが見られるが、これは BN の水への分散性が低く容易に凝集するため、低濃度の分散液を作成中に凝集し、1ppm 以下の低濃度域で正確な分散液とならず、目標より低めの BN 濃度になったことが一因と考えられる。

・細胞毒性試験では主として物理的な成長阻害の影響を受けており、微粒子の種類による差は明確ではない。中でも BN ナノチューブは凝集性が高く、容易に凝集体を形成して培養容器内で沈殿を生じるため、やや低い細胞活性及び生存細胞数を示したものと考えられ、これが BN ナノチューブの細胞毒性を示す物ではないと思われる。但し、昨年度の研究に於いて、BN ナノチューブと細菌類が結合しやすいことが見出されており、細胞にも捕集される可能性

が考えられる。細胞と BN が結合しやすい場合には、培地全体での濃度は低くても細胞近傍での BN 濃度が高くなり、影響を受けやすい可能性が考えられる。

・ BN は短期的には生体不活性 (bio inert) と考えられるが、形態観察からは

サイズ：肺胞まで到達するサイズ

形状：柔軟性がほとんど無く、剛直な針状

生分解性：溶解性や生分解性は低い

の点でアスベストと共通するところもあり、これらの影響は不明であるが、呼吸器系からの長期大量の暴露には注意した方が良いと思われる。

E. 結論

BN ナノチューブやアスベスト類、カーボンナノチューブの細胞毒性を評価し、それらの細胞毒性は主として凝集し沈殿した粗大粒子が細胞を物理的的刺激するためであり、BN ナノチューブやカーボンナノチューブの化学的な安定性を考慮して、特段の毒性が無いものと考えられた。また BN ナノチューブは口腔内の齲蝕原因菌に親和性が強く、口腔内の細菌除去による齲蝕予防の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aida J, Ando Y, Aoyama H, tango T, Morita M. An ecological study on the association of public dental health activities and socio-demographic characteristics with caries prevalence in Japanese 3-year-old children, *Caries Res* 40: 466-472, 2006.
2. 森田 学. 永久歯の抜歯原因に関する全国調査. 財団法人 8020 推進財団会誌 5:84-87, 2006.
3. 藤澤雅子, 森田 学, 熊澤隆樹, 角田裕子: 卒業時の学生が習得した態度・行動 ~「情意」という側面からの考察~, 日本歯科医学教育学会雑誌 22: 72-77, 2006.
4. 高橋太郎, 相田潤, 兼平孝, 竹原順次, 森田学: 口臭の自覚に関連した因子の検討, 口腔衛生学会雑誌 56: 198-200, 2006.
5. Aida J, Ando Y, Akhter R, Aoyama H, Masui M, Morita M. Reasons for Permanent Tooth Extractions in Japan, *J Epidemiol* 16: 214-219, 2006.
6. Sugimoto J, Kanehira T, Mizugai H, Chiba I, Morita M. Relationship between salivary histatin 5 levels and *Candida* CFU counts in healthy elderly, *Gerodontology* 23; 164-169, 2006.
7. 根岸 淳, 宇野 滋, 飯塚 正, 佐藤嘉晃, 山本恒之, 加我正

行, 森田 学, 吉田重光: 本学歯学部における「学生による臨床実習評価」の解析, 日本歯科医学教育学会雑誌 22: 257-263, 2006.

2. 学会発表

1. 相田 潤, 森田 学, 安藤雄一: 12 歳児う蝕の地域格差にフッ化物洗口が与える影響の分析, 日本疫学会, 名古屋, 2006.
2. Morita M, Aoyama T, Aida J. Factors associated with the longevities of restorations in posterior teeth, 84th IADR meeting, Brisbane, 2006.
3. Aida J, Morita M, Akhter R, Aoyama H, Masui M, Ando Y. Association of dental condition with reasons for tooth extraction, 84th IADR meeting, Brisbane, 2006.
4. Akhter R, Hassan NMN, Aida J, Zaman K, Morita M: Sequel of caries reasons for tooth extraction in Bangladeshi adolescents, 84th IADR meeting, Brisbane, 2006.
5. 相田潤, 森田学, 新美完, 大坂美貴子, 安藤雄一: 地域社会が 3 歳児のう蝕経験に及ぼす影響—マルチレベル分析を用いた検討—, 第 55 回日本口腔衛生学会総会, 大阪, 2006.
6. 栗田啓子, 大久保留加, 高橋太郎, 竹原順次, 中村公也, 森田学: 幼児の歯科受診行動の相違とう蝕発生, 第 55 回日本口腔衛生学会総会, 大阪, 2006.
7. 本多丘人, 谷 宏, 森田学: 現代青年の歯科保健に関する知識, 第 55 回日本口腔衛生学会総会, 大阪, 2006.
8. 兼平孝, 高橋太郎, 相田潤, 森田学: 年齢層別のヒト全唾液中のラクトフェリン量に関する研究, 第 55 回日本口腔衛生学会総会, 大阪, 2006.
9. 高野知承, 竹原順次, 森田学: 非う蝕性歯頸部欠損と歯磨き習慣, 咬合力, 咬合接触面積および平均圧力との関係, 第 55 回日本口腔衛生学会総会, 大阪, 2006.
10. Akhter R, Hassan NMM, Aida J, Zaman K, Morita M: Stress and temporomandibular disorders in group of patients seeking treatment in a dental hospital, 7th Congress of Asian Academy of Preventive Dentistry, Okayama, 2006.
11. Aida J, Oosaka M, Niimi K, Morita M: Contribution of social context to inequality in dental caries: A multilevel analysis of Japanese 3-year-old children, 7th Congress of Asian Academy of Preventive Dentistry, Okayama, 2006.

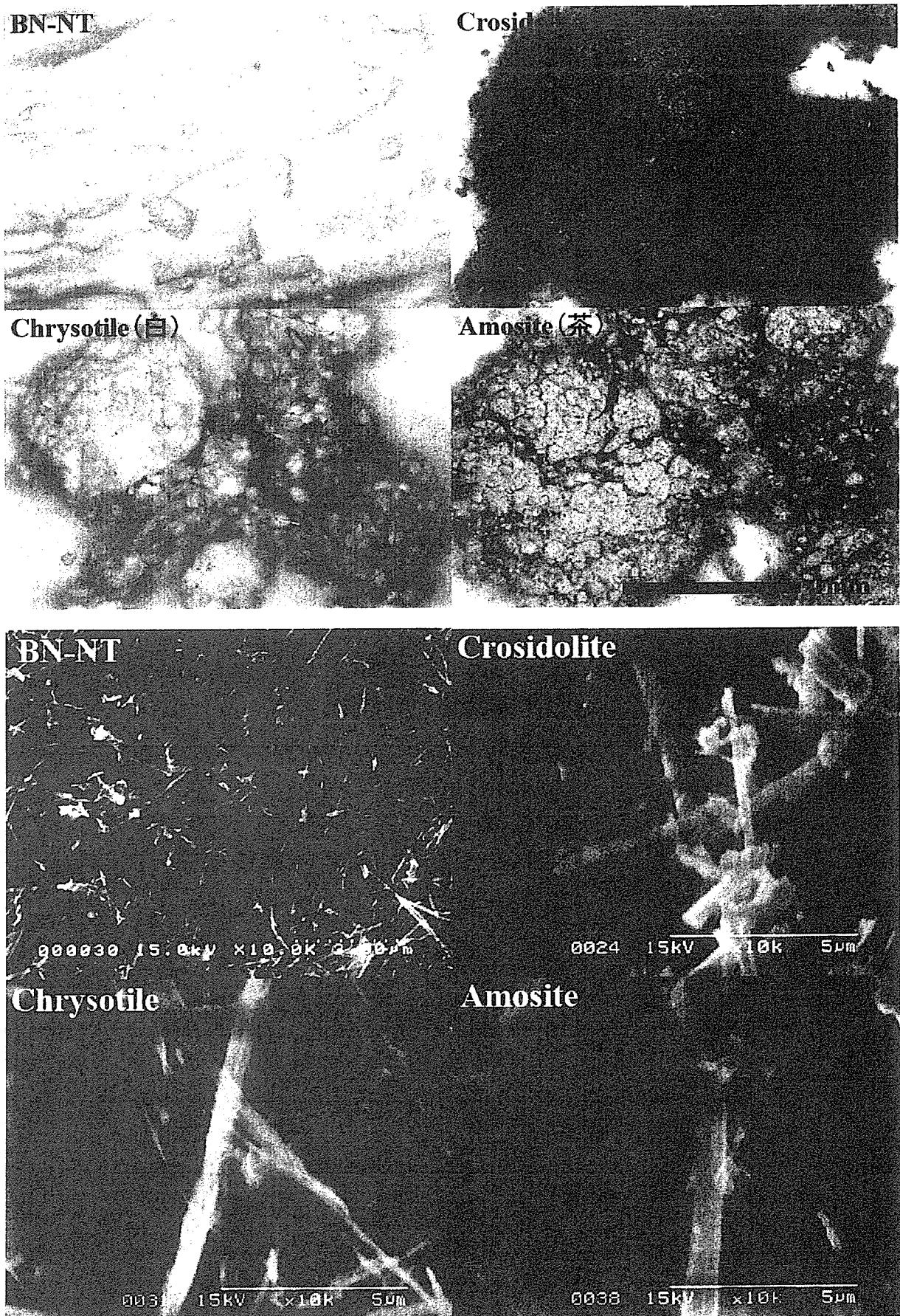


図1 BN及びアスベスト類の光学顕微鏡像及びSEM像