

繊維状ナノ微粒子（アスベスト、BNナノチューブ）の細胞毒性評価と BNナノチューブ／チタン複合材料の作製

北海道大学大学院歯学研究科

○宇尾基弘・阿部薫明・赤坂 司・森田 学・亙理文夫

東北大学大学院環境科学研究科

佐藤義倫・田路和幸

東北大学金属材料研究所

大森 守

1. はじめに

アスベスト類は天然のナノサイズの繊維質であり、アルミノシリケートを主成分とする安定な酸化物であるため熱的・化学的耐久性に優れていることから建材・断熱材・耐火材・シール材などに幅広く利用されてきた。しかしながら微小繊維の吸入による呼吸器系への障害が問題となっており、これを機に他のナノ微粒子の安全性も懸念されるようになった。そこで本研究では

2. 実験方法

2-1 細胞毒性試験

BNナノチューブ、MWCNTs（直径30nm）アスベスト {クロシドライト(青)クリソタイル(白)アモサイト(茶)} をリン酸緩衝液に分散し、培養液中に0.01～100ppmとなるよう添加した。ラット繊維芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を細胞数が 10^4 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。細胞のウェル底面への静着後に上記材料の分散液を250 μ lずつ添加し1～3日間培養し、比色定量試薬 Alamer blue (Biosource, CA, USA) により培養後の細胞活性を評価すると共に、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。

2-2 複合材料の作製

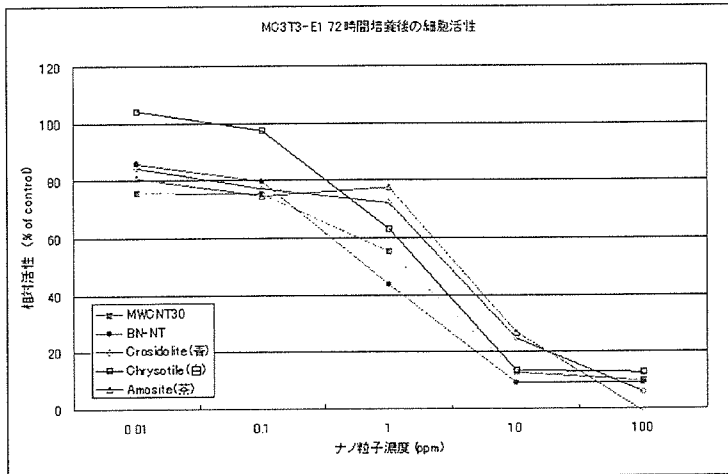
BNナノチューブを5wt%となるよう水素化チタン粉末に混合し、放電プラズマ焼結装置により900℃で10分間焼結した。焼結体を約1mm角に切断後、3点曲げ試験により曲げ強度を測定し、SEMで微細構造を観察した。

3. 結果

3-1 細胞毒性試験

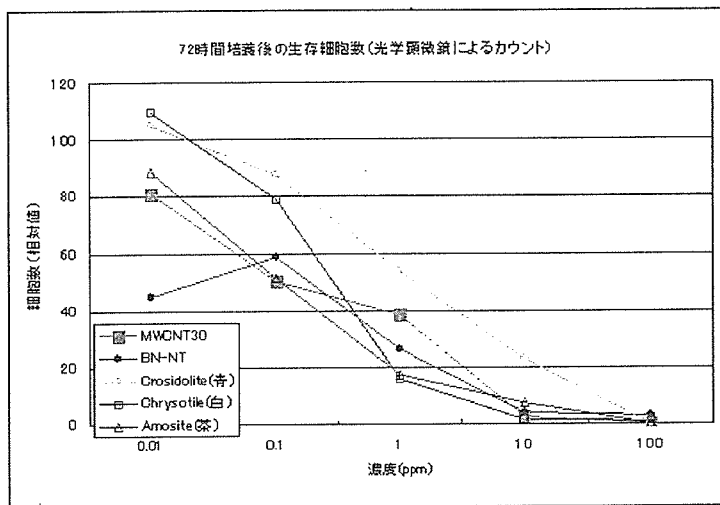
24～72時間培養後の粒子濃度と細胞活性（粒子のない場合＝Controlを100%とした）の関係と、

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）の結果を次に示す。



24, 48, 72 時間、いずれの培養時間でも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。

下図は 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。

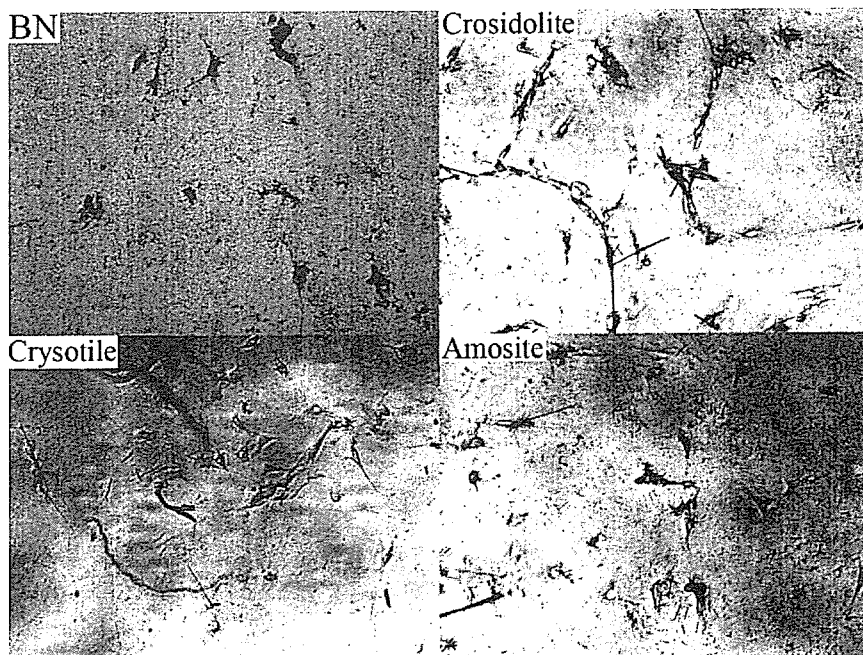
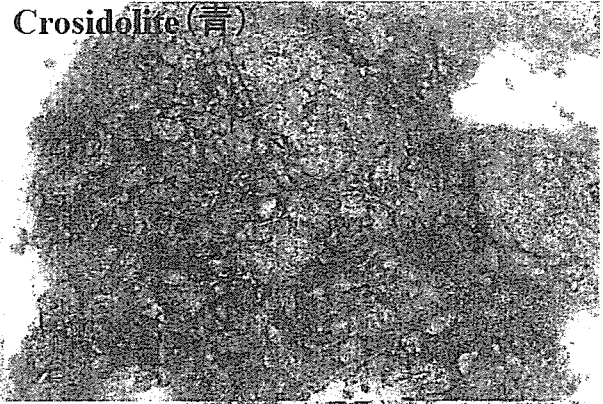


図 BN 及びアスベスト類を培養した細胞の光学顕微鏡写真（48 時間培養後）

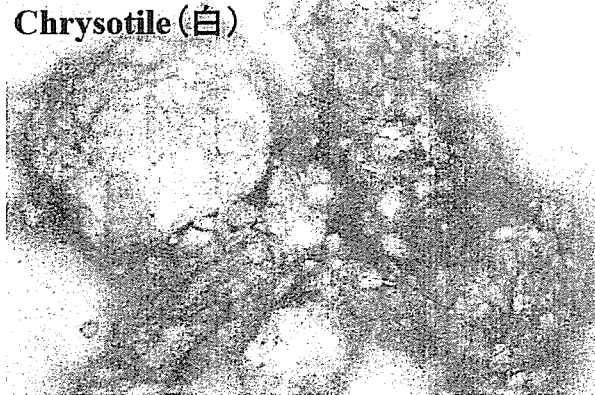
BN-NT



Crocidolite (青)



Chrysotile (白)



Amosite (茶)

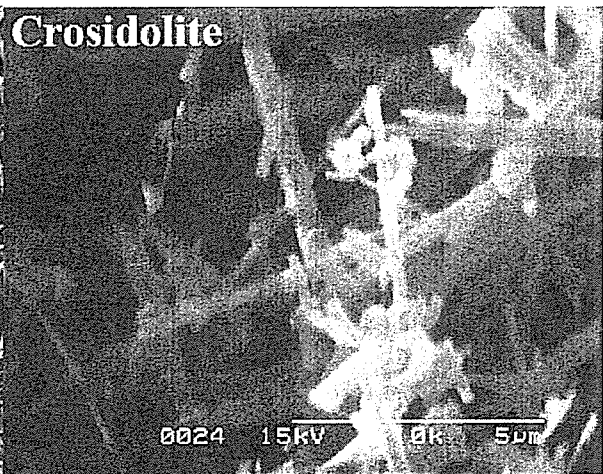
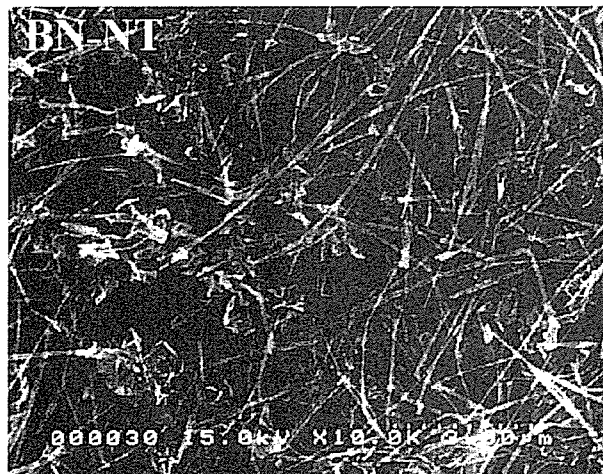
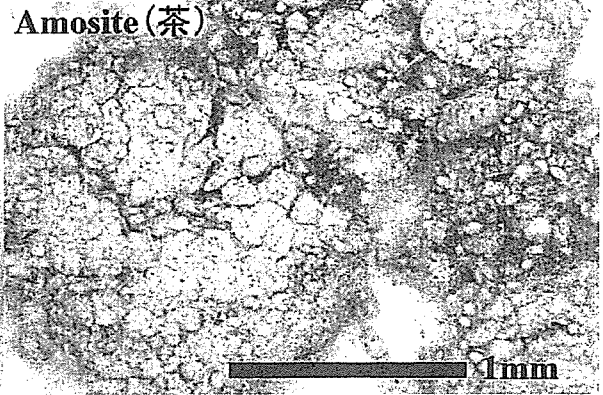
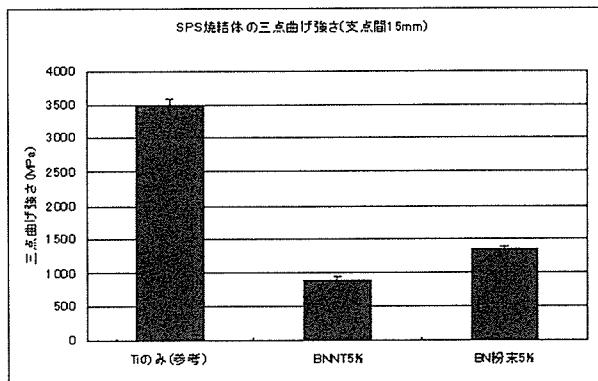


図 BN 及びアスベスト類の光学顕微鏡像及び SEM 像

3-1 細胞毒性試験

BN ナノチューブ/チタン複合材料の作製



左図に BN ナノチューブおよび比較として結晶質の BN 粉末を 5wt%添加して放電プラズマ焼結(SPS)した試料の曲げ試験結果を示す。

BN 添加により曲げ強度が低下しており、SEM 観察で BN ナノチューブ (BN 粉末も) の凝集体が多く確認されたことから、混合時の不均一による強度低下が大きいと考えられる。但し、焼結体そのものは金

属光沢があり、目視では欠陥や気孔の見られないものが得られており、SPS により BN ナノチューブとチタンを焼結することが可能であることが分かった。また BN ナノチューブ添加により密度はやや低下し、 4.0g/cm^3 (チタンは 4.51) とやや軽量の複合体が得られた。

4. 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に見られるが、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。

【今後の方針】

- ・ より正確な毒性評価のため、BN の水への分散性を高める必要があると考えられる。
- ・ 複合体については BN ナノチューブとチタン粉末の均一混合について、特に BN ナノチューブの単分散について条件を模索する必要がある。

ナノ材料の健康・環境影響評価のための ナノカーボンの成長とその物性

名古屋工業大学大学院
都市循環システム工学専攻
○林靖彦・奥山文雄

1. はじめに

フラーレン (C_{60}) やカーボンナノチューブ (CNTs: Carbon Nanotubes) に代表されるナノカーボン材料によるナノテクノロジーは近年目覚ましい発展を遂げています。これらナノ材料の製造や新規応用を目指す研究者や製造者において、製品開発 (研究開発) から製造の段階でナノ材料が人間の健康、生態系、環境にどのように影響するかなど、安全性に対する十分な検討がこれまでなされなかった。しかし、製造技術が進展し、比較的手に入りやすくなったナノ材料による製品が世の中に出始めた現在において、安全性を無視した研究開発や製品開発はナノテクノロジー産業の衰退を引き起こすことも考えられる。一方で、ナノ材料による癌細胞をターゲットにしたドラッグデリバリーシステム (DDS)、微量成分の検出あるいは除去など、人間の生命に密接に関連する医療分野への応用が今後盛んに研究されることが予想されている。

ナノテクノロジーがグローバル市場を狙うためには、ナノ材料の特性を科学的方法によって把握し、人間の健康と環境安全に対する潜在的影響 (ハザード、リスク) を評価しなければならない。カーボンナノチューブは直径数nmの針状物質で形状がアスベストと類似していることから、アスベスト同様に発ガン性等の悪影響を及ぼすのではないかと懸念されている。

本稿では、ナノテクノロジーに対する安全性に取り組む上で参考になる、ナノカーボン材料特にCNTsに注目して、その成長 (製造) と物性について述べ、健康・環境影響評価するための問題点と現状、医療応用に関する最新の報告について説明する。

2. カーボンナノチューブの成長 (製造)

カーボンナノチューブを成長する方法は様々なタイプがあるが、大別すると図1に示すような「アーク放電法」、 「レーザ蒸発法」、 「化学的気相成長法 (CVD: Chemical Vapor Deposition)」 の3方法のうちのどれかに分類される。

図1(a)に示すようにアーク放電法は、2つの炭素電極棒間でアーク放電を発生させる。このとき、炭素棒に微量の金属 (Fe, Co, Niなど) を含ませ、Ar やHe 不活性ガス雰囲気中でアーク放電を行うとチャンバー内や陰極の炭素電極生じた煤が生じ、それらの中に単層カーボンナノチューブが得られる。アーク放電により炭素電極は3000~4000°Cに加熱され炭素および触媒金属が蒸発し、そ

の後成長装置内で冷却されていく過程で金属の触媒作用によりカーボンナノチューブが成長する。一般的に、アーク放電法による生成は生成量が比較的多い半面、単層カーボンナノチューブの純度が低い。

図2(b)の示すようにレーザー蒸発法は、電気オープンで中央部の金属を微量（数 at%）含む炭素ロッド周辺をAr ガス中で1200°C

程度に加熱する。そして炭素ロッドにレーザー照射すると、その時約6000 °C近くにまで加熱され、炭素及び金属を蒸発する。蒸発した炭素及び金属はAr ガスの流れに乗りながら冷却され、その際金属の触媒作用によって単層カーボンナノチューブが生成される。単層カーボンナノチューブは後方のロッド表面に付着する煤の中に得られる。アーク放電法と比較してレーザーオープン法は、生成条件を電気オープン温度、Ar ガス流速、触媒種類などを制御して生成することが可能である。この方法で成長した単層カーボンナノチューブは、直径分布が狭いこと、ファンデルワールス力により多数が束状に集まるバンドルを形成している。しかし、本法で作製したカーボンナノチューブの成長量が少なく、大量合成には不向きであるが、成長の制御が可能であり生成物中に含まれる単層カーボンナノチューブの割合は非常に高いため、多くの場合研究目的で用いられる。

化学的気相成長法は、600~800°Cに加熱した反応容器に炭素源と触媒金属を連続的に投入することができ、カーボンナノチューブの連続生成が可能であるため、大量合成を目指した「熱CVD法」の研究がなされてきた（図2(c)を参照）。炭素の供給源として、ベンゼン、メタン、アセチレンなどの炭化水素ガスを持ちいる方法、一酸化炭素ガスを用いる2つに分類できる。特に後者は、高圧にした一酸化炭素を加熱してナノチューブを合成する方法で、HiPco法（high-pressure carbon monoxide process）と呼ばれ、レーザーアブレーション法に比べて直径の小さいナノチューブが得られる特徴がある。触媒としてはフェロセン、ニッケルセンなど有機金属を熱分解して得られる金属クラスターや、カルボニル鉄（Fe(CO)₅）などがもちいられる。これまでに、多孔性の触媒を用いることでカーボンナノチューブの収率を大きく上昇させた。

熱CVD法とはことなり、反応容器に入れた基板を600~800°Cに加熱同時に反応容器の中に高周波やマイクロ波の電界をかけ、供給した炭素源に電子を衝突させガスがプラズマとなり、基板にカーボンナノチューブを成長する「高周波プラズマCVD法」、 「マイクロ波プラズマCVD法」（図2(d)を参照）により、基板の特定の場所にカーボンナノチューブを成長させ、ナノスケールの電子素子の作製を目指した研究が行われている。しかし、「アーク放電法」、 「レーザー蒸発法」と比べて工業的な大量生産に向いている一方で、単層カーボンナノチューブの作製には向かず構造欠陥も多い

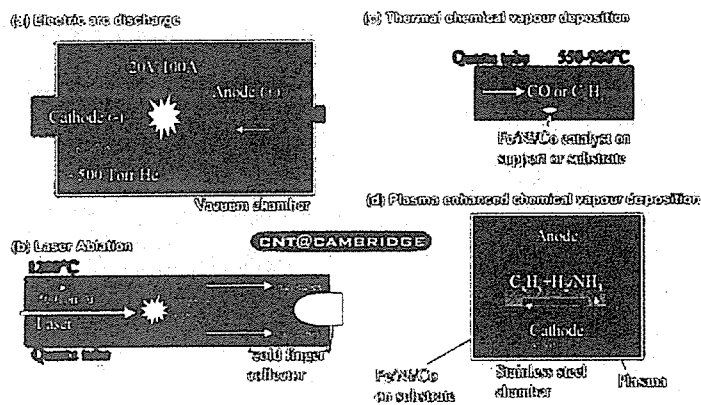


図1. カーボンナノチューブの成長方法

など、作製したカーボンナノチューブの質はあまり高いとはいえない。

カーボンナノチューブの製造現場では、高純度精製法や大量合成技術を確認しつつ、直径や螺旋度 (chirality) やナノチューブの積層構造などのナノ構造を制御する技術の開発が進められている。現在、Hyperion Catalysis International (100t/y)、昭和電工 (カーボンナノファイバー: 公称>20t/y)、三井物産 (多層カーボンナノチューブ:>20t/y)、NANOCYL (多層カーボンナノチューブ2層カーボンナノチューブ:<5t/y)、CNI (HipCo法単層カーボンナノチューブ: 200g/day)、その他中国や韓国で大量生産されている。

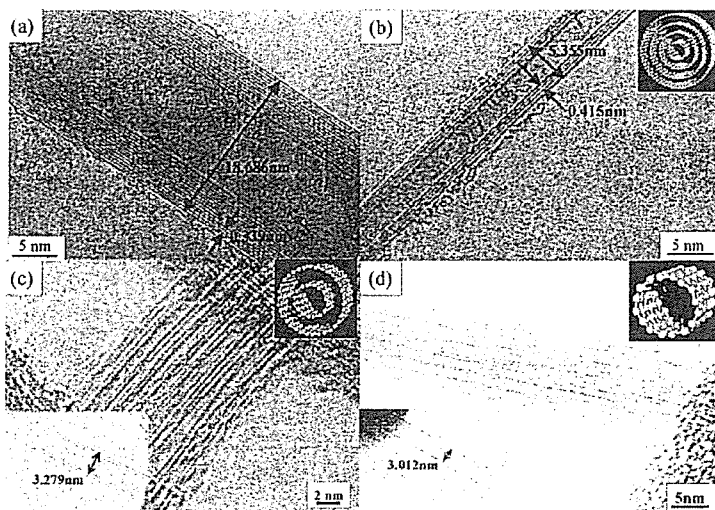


図2. カーボンナノチューブの透過型電子顕微鏡像

3. カーボンナノチューブの基礎物性

カーボンナノチューブは、1枚のグラファイト (グラフェンシート) を筒状に巻いた簡単な構造であるが、筒状の直径とその巻き方である螺旋度により特に電気的特性 (導電性) が大きくかわる。理論的にも実験的にも単層カーボンナノチューブの構造は、「カイラルチューブ」、「アームチェアチューブ」、「ジグザグチューブ」の3つのタイプの分類される。これらの構造はカイラル指数(m,n)で示される任意の六員環を原点(0,0)に重ねるようにグラフェンシートを丸めてチューブを形成し、その構造と物性はカイラル指数(m,n)によって定義される。また、螺旋角度 $\theta=0^\circ$ のとき「ジグザグチューブ」、 $0^\circ<\theta<30^\circ$ のときカイラルチューブ、 $\theta=30^\circ$ のとき「アームチェアチューブ」となる。単層カーボンナノチューブの電子構造は、チューブ径およびカイラル角度により大きく変化し、単層カーボンナノチューブの1/3が金属的で、残りの2/3は半導体的特性を示す。一般的には単層カーボンナノチューブの直径分布は、0.4-3nm付近に集中していることが透過型電子顕微鏡やラマン分光法の評価から分かっている。また、カーボンナノチューブの密度1.33~1.40g/cm³程度であることが報告されている。

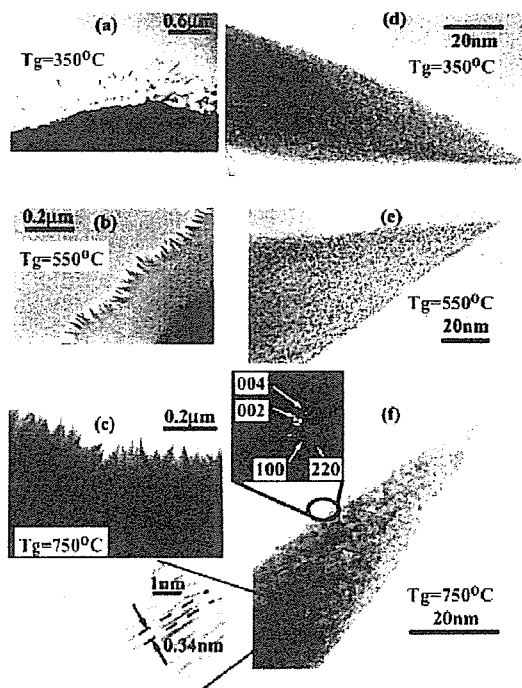


図3. カーボンナノファイバーの透過型電子顕微鏡像

一方グラフェンシートが入れ子状に積層した多層ナノチューブに関しては、それぞれの層のナノチューブの電気的性質はお互いの相関により電気的特性が決まるが、各層ごとの電気的特性の評価が困難なため詳細な電気的特性は分かってない。多層ナノチューブの直径分布は10nm以上で、密度1.89~2.1g/cm³程度であることが報告されている。

構成するグラフェンシートの数の違うカーボンナノチューブの透過型電子顕微鏡により評価した結果を図2に示す[1,2]。図2(c), (d)は、2層カーボンナノチューブおよび単層カーボンナノチューブがバンドルを形成している。一般に、カーボンナノチューブの径が大きくなるに従って、半金属のグラファイトに近い特性を示し、直径が数100nm程度になると量子効果とバルク効果の共存した両特性を示す。このような範疇の材料を一般的にカーボンナノファイバーと呼んでいる。カーボンナノファイバーには、図3に示すチューブ内がグラフェンシートで詰まった状態[3]、カーボンナノチューブとは異なったカップ積層型カーボンナノチューブも含まれる。図2, 3で示すように、様々なタイプの針状カーボンナノ材料が存在することが分かる。

カーボンナノチューブの典型的な基礎物性を表1にまとめた。一つの材料で優れた機械的物性から電気的特性を有する材料はこれまでになく、電子デバイス、電池電極添加剤（燃料電池）、電界電子放出材料、ガス吸着、触媒担持材料、構造強化剤、導電性添加剤などへの広範囲の応用・実用化研究が進んでいる。我々の研究に、カーボンナノチューブに強磁性金属を内包し医療への応用も検討している。

表1. カーボンナノチューブの典型的な物性

- 機械的強度
 - ・ 軸方向の変形に対して、固くて強い
 - ・ ヤング率：0.4-4TPa, 0.6TPa（ダイヤモンド）
 - ・ 引張強度：40-60GPa, 1.9-2.3GPa（高張力鋼）
 - ・ 曲げ変形に対して弾力性に富む（破断せずに曲がり復元する）
- 電気的特性
 - ・ 金属・半導体・絶縁体：グラフェンシートの巻き方
 - ・ 金属的ナノチューブ：バリスティック伝導*（100μm@RT）
 - ・ 高い電流密度（100MA/cm²），高電子速度（Siの10倍）
- 熱伝導率
 - 6000W/m・K@RT, ダイヤモンドの数倍の熱伝導性
- 耐熱性
 - 2800°C（真空中），750°C（空气中）

*伝導を担うキャリアが格子振動や不純物などの散乱を受けずに伝導

4. ナノ材料の健康・環境影響評価のためのカーボンナノチューブの可溶化、チューブ径制御

カーボンナノチューブの人間への健康と環境安全に対する潜在的影響を評価する際、カーボンナノチューブの成長に必要な金属粒子を含んだもの、カーボンナノチューブのサイズ（長さおよび径）、カーボンナノチューブとの複雑な混合物などの影響をどのように考慮するべきかを議論する必要がある。例えば、単一の単層カーボンナノチューブはnmスケールであるが、アーク放電法や熱CVD法で成長した直後は束状のバンドルを形成しており、その大きさはμmからmm程度にまでなる。またそのバンドルには触媒金属が含まれており、一般に酸溶液などにより金属を取り除き、その後大気中もしくは酸素中で加熱してカーボンナノチューブ・バンドルを純化・精製（欠陥のあるカーボンナノチューブの除去）する。しかし、バンドルを簡単に分散や溶媒可溶化させる有効な方法は

これまでに報告されていない。また、一端分散したカーボンナノチューブは、ファンデルワールス力により再度バンドルに凝集する。（図2dを参照）

カーボンナノチューブの溶媒可溶化や水への分散が可能になると、これまでに以上にカーボンナノチューブの応用が広がることが予測される。このため、カーボンナノチューブの溶媒可溶化の研究が精力的に行われてきた。図4に示すように中嶋等や著者らは、デオキシリボ核酸（DNA）を用いて、カーボンナノチューブにDNAがラッピングすることでの水への分散に成功している[4]。著者等は、DNAを使うことでカーボンナノチューブを生理食塩水へ可溶させることも確認している。この他、カーボンナノチューブの表面に親水基を付与することで水への分散に成功している。しかし、可溶した試料を乾燥させると再度凝集しバンドルを形成する。

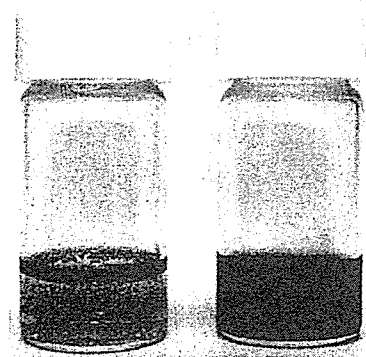


図4. 水に入れたカーボンナノチューブ（左），分散したカーボンナノチューブ（右）

カーボンナノチューブの長さの制御は、化学的気相成長法の場合成長時間を制御することで比較的制御可能であるが、アーク放電法、レーザー蒸発法では一般に困難である。カーボンナノチューブの径の制御は、成長の際に用いる微粒子触媒金属粒子（Fe, Co, Ni など）の大きさである程度制御できることが分かっている。径の制御と成長のメカニズムと密接に関連しており、化学的気相成長法の場合、ナノサイズの金属粒子の触媒作用により炭化水素ガスが反応し、過飽和状態になったカーボン原子が金属粒子から析出してチューブ構造層を成長するメカニズムが提案されている。しかし、アーク放電法、レーザー蒸発法では、極細カーボンナノチューブの成長は可能であるが、その径を制御は困難である。

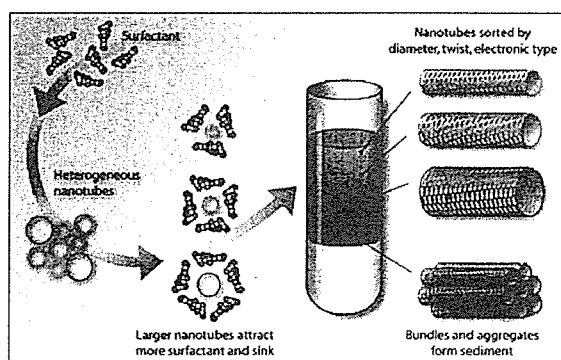


図5. Single-walled carbon nanotubes are coated in soap-like molecules called surfactants, then spun at tens of thousands of rotations per minute in an ultracentrifuge. The resulting density gradient sorts the nanotubes according to diameter, twist and electronic structure.

最近、ノースウェスタン大学のHersam等は、図5に示すように界面活性剤（石鹸のような分子）によって水中でカーボンナノチューブをコーティング、超遠心分離機により密度の違いでカーボンナノチューブを直径と電子構造（半導体か金属的振舞いのどちらかを）で分類する方法を報告している[5]。これまでに、カーボンナノチューブを様々な物性毎に選別する方法が提案されているが、実用には至っていない。

カーボンナノチューブの製造（成長）からそれを用いた製品の廃棄までの過程で、カーボンナノチューブの特性や様態が異なる。カーボンナノチューブの人間への健康と環境安全を評価する際に、

この点も含め下記の点を考慮するべきと著者等は考えている。

- ・ カーボンナノチューブの製造規模（大量生産現場なのか研究室レベルなのかなど）
 - ▶ 大量生産現場では、飛散したバンドル状のカーボンナノチューブを吸引する可能性がある。
- ・ カーボンナノチューブの品質
 - ▶ 微粒子触媒金属粒子を取り除いたものか、純化・精製したカーボンナノチューブなのか
- ・ カーボンナノチューブをもちいた製造
 - ▶ 例えば、カーボンナノチューブと他の材料との複合材料の製造
- ・ カーボンナノチューブを含み製品の廃棄と処理

5. カーボンナノチューブの医療への応用例

カーボンナノチューブの医療への応用が試みられている。これまでに静脈注射によるカーボンナノチューブのマウスの体内分布（Biodistribution）に関する2論文が発表され[6,7]、体内に取り込まれたカーボンナノチューブは直ぐに对外に排出され肝臓や脾臓への吸収は無く、ペプチド修飾ポリエチレングリコール（PEG）とカーボンナノチューブの複合体（PEG-CNT）は、腫瘍に効果的に蓄積されることが報告されている。しかし、最近スタンフォード大学のDai, Chen等のグループから、前述の結果とはことなる結果をNature Nanotechnologyに発表している。図6, 7に示すように、ペプチドで修飾および非修飾したPEG-CNTのマウス体内分布を定量的に評価したところ、両複合体とも血中循環時間が長く肝臓や脾臓への吸収が、明らかな毒性や体内へのマイナスの影響（体重減少や疲れなど）は観測されなかったことを報告している[8,9]。一方で、Dai, Chen等は同論文の中で、人体への影響は長時間の試験で慎重に判断するべきとコメントしている。

日本電気株式会社のグループは、カーボンナノチューブの一種であるカーボンナノホーン（直径2~5nm、長さ40~50nm）に抗癌剤であるシスプラチンを内包させることに成功した。癌細胞が100nm程度のサイズの物質を取り込みやすいという特徴を利用し、抗癌剤を内包したカーボンナノホーンを血液で輸送させカーボンナノホーン集合体(直径100nm程度)を悪性腫瘍に特異的に蓄積し、抗癌剤内包ナノホーンが悪性腫瘍で抗癌剤を徐々に放出するドラッグキャリアシステムの可能性を示した[10]。

カーボンナノチューブなどナノ材料を医療に応用する際に重要となる特徴の一つとして、そのnmサイズがある。一般に、腫瘍が100nm程度のサイズの物質を取り込みやすいという特徴があるため、これらのナノ材料をもちいたドラッグデリバリーシステム（DDS）などへの応用が期待できる。片浦等は、異なる直径のカーボンナノチューブの光吸収スペクトルを測定し[11]、直径が細くなるに従って吸収スペクトルが高エネルギー側にシフトすることを報告している。この特徴を利用すると、体内の腫瘍に送り込まれたカーボンナノチューブを利用して、外部から赤外レーザーを腫瘍部分に照射することで、カーボンナノチューブは赤外光を効果的に吸収して腫瘍をピンポイントで温度を上

げて死滅させることができる。

6. まとめ

本稿では、カーボンナノ材料であるカーボンナノチューブに対する人体や環境への安全性に取り組む上で参考になる、カーボンナノチューブの成長（製造）とその物性について述べた。健康・環境影響評価のためのカーボンナノチューブの可溶化、チューブ径制御の現状と、実際の評価にあたっての注意点を指摘した。カーボンナノチューブは、医療分野応用への期待が大きく既に応用事例が報告されており、明らかな毒性や人体への影響評価は長時間の試験により明らかにする必要があることが指摘されている。

参考文献

- [1] 遠藤守信, 村松寛之, 江坂昌也, 金隆岩, 林卓哉, 「カーボンナノチューブ、ナノファイバーの量産」 繊維学会誌, 59, 412-416 (2003).
- [2] 林卓哉, 村松寛之, 金隆岩, 夏木俊明, 遠藤守信, 「気相成長カーボンナノチューブ・ナノファイバーの合成とその構造解析」, 表面科学 25, 352-358 (2004).
- [3] Y. Hayashi, T. Tokunaga, Y. Yogata, S. Toh, K. Kaneko, T. Soga, T. Jimbo, "Corn-shape carbon nanofibers with dense graphite synthesized by microwave plasma-enhanced chemical vapor deposition",

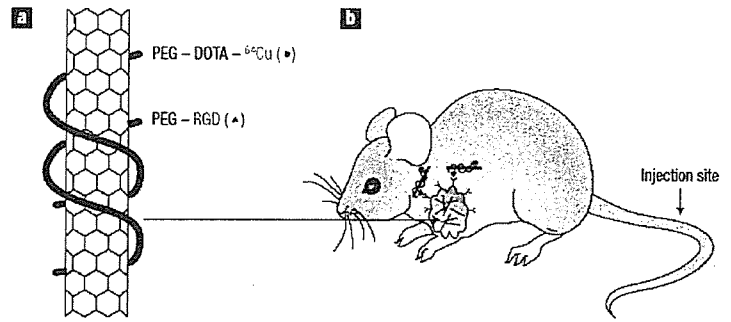


図6. Targeting tumours with single-walled carbon nanotubes.

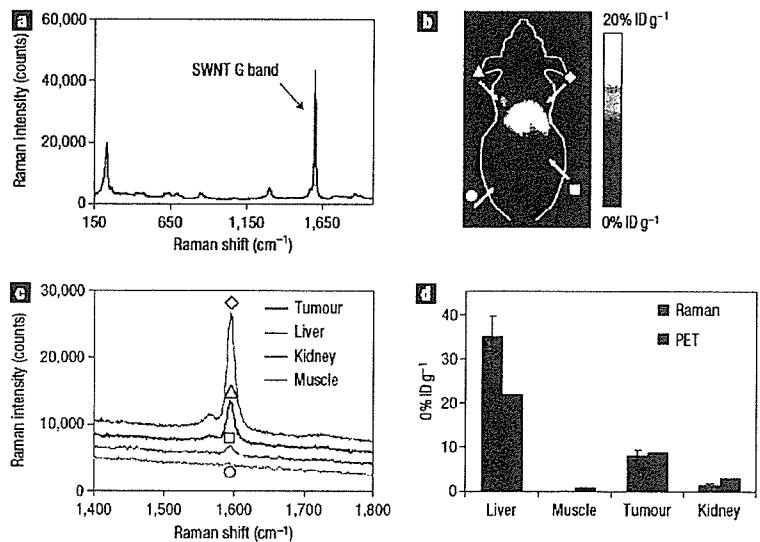


図7. Detecting nanotubes in mice tissues using characteristic

Raman signatures of SWNTs. a, A Raman spectrum of a solution of SWNT-PEG5400. b, A twodimensional projection of the microPET image of a U87MG tumour-bearing mouse 8 h p.i. of a high dose of SWNT-PEG5400-RGD solution. The arrows point to the tumour. c, Raman spectra in the G-band region of SWNTs recorded on lyophilized tumour and tissue powder samples suspended in surfactant solutions. d, Comparison of the biodistribution data obtained by PET imaging and ex vivo Raman measurements.

Appl. Phys. Lett., 84, 2886-2888 (2004).

[4] N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai, K. Yoshikawa, "DNA Dissolves Single-walled Carbon Nanotubes in Water", Chem. Lett. **32**, 456-457 (2003).

[5] M. S. Arnold, A. A. Green, J. F. Hulvat, S. I. Stupp, M. C. Hersam, "Sorting carbon nanotubes by electronic structure using density differentiation", Nature Nanotech. **1**, 60-65 (2006).

Web site: <http://www.photonics.com/content/news/2006/October/6/84639.aspx>.

[6] H. Wang, J. Wang, X. Deng, et al. "Biodistribution of carbon single-wall carbon. nanotubes in mice", J. Nanosci. Nanotechnol. **4**, 1019-1025 (2004).

[7] R. Singh, D. Pantarotto, L. Lacerda, et al., "Tissue Biodistribution and Blood Clearance Rates of Intravenously Administered Carbon Nanotube Radiotracers", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103**, 3357-3362 (2006).

[8] Y. Liu¹, H. Wang, "Nanotechnology tackles tumours", Nature Nanotech. **2**, 20-21 (2007).

[9] Z. Liu, W. Cai, L. He, et al., "In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice", Nature Nanotech. **2**, 47-52 (2007).

[10] 日本電気株式会社プレスリリース, 「カーボンナノホーンへの抗癌剤内包に成功」,
<http://www.nec.co.jp/press/ja/0511/0903.html>

[11] <http://staff.aist.go.jp/h-kataura/Kogaku-kiji-forweb.htm>

コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした細胞培養担体の開発

¹ 北大院・歯・口腔内科

² 北大院・歯・理工

³ 高研バイオサイエンス研究所

⁴ 北大名誉教授

○寺田典子¹、宇尾基弘²、久保木芳徳^{3, 4}、北川善政¹、亘理文夫²

1. 緒言

カーボンナノチューブは、青木らの研究により生体親和性があると確認されており、コラーゲンとも親和性が高いことが判明している。他方では、現在の細胞培養用ディッシュはコラーゲンコートされた担体が高い細胞付着性を持つことから、細胞培養に頻用されている。そこで、コラーゲンコートされたディッシュに親和性のあるカーボンナノチューブを吸着させ、細胞培養担体の開発を目的とした研究を行った。

2. 実験方法

1. コラーゲンコートディッシュへのMWCNTsのコーティング条件の検討（界面活性剤の種類、MWCNTsの濃度、ディッシュへの作用時間の影響）

- a) MWCNTs (CNT Inc.) を 500°C×90分酸化処理し塩酸洗浄して精製した。一部試料については分散性を高めるため、親水基を付与して使用した。（親水基付与についてはH. Peng. et al., JACS, 125, p. 15174, 2006 に基づく）
- b) 界面活性剤としてTRIRON X-100 (Sigma)、コール酸ナトリウム（東京化成）の0.1%、0.5%、1%水溶液を用いた。
- c) TRITON溶液、コール酸ナトリウム溶液に、MWCNTsが1~1000ppmとなるように調整した（以降、MWCNTs分散液と呼ぶ）。
- d) コラーゲンディッシュ（φ35mm、IWAKI）にMWCNTs分散液2ccを注ぎ、1~6時間静置にしてMWCNTsをディッシュ表面に吸着させ、洗浄・乾燥した。（これを以降CNTコートディッシュと呼ぶ。）また一部SEM観察用にコラーゲンコートカバーガラス（φ25mm、IWAKI）にも同様の処理を施した。（以降CNTコートカバーガラスと呼ぶ）
- e) 得られたCNTコートディッシュ（カバーガラス）表面のMWCNTs付着状態をSEM（日立製作所 S-4000）にて観察した。

2. 細胞毒性、細胞活性、細胞のSEM観察、細胞の付着性の検討

- a) CNTコートカバーガラス表面に、ラット線維芽細胞様細胞（MC3T3-E1細胞）を1×

10^5 cells/dishとなるよう播種した。培地は α -MEM (Minimum Essential Medium、GIBCO™) +10%FBS (biowest) を用い、37℃、5%CO₂にて1~3日間培養とした。

c) 経時的（培養1、2、3日）に①細胞毒性の評価②SEMでの観察③細胞付着性を解析した。

①細胞毒性（培養後、ギムザ染色（Giemsa's solution (MERCK)）を行い形態観察も同時に行った。）

i) 細胞活性：Alamer blue (BIOSOURCE) を用いた比色測定で、 $\lambda=570\text{nm}$ と $\lambda=600\text{nm}$ の吸光度差を測定した。

ii) 細胞数・細胞質被覆率：通法に従い固定、ギムザ染色後、光学顕微鏡観察により、細胞数を数え、細胞数と細胞被覆率を求めた。

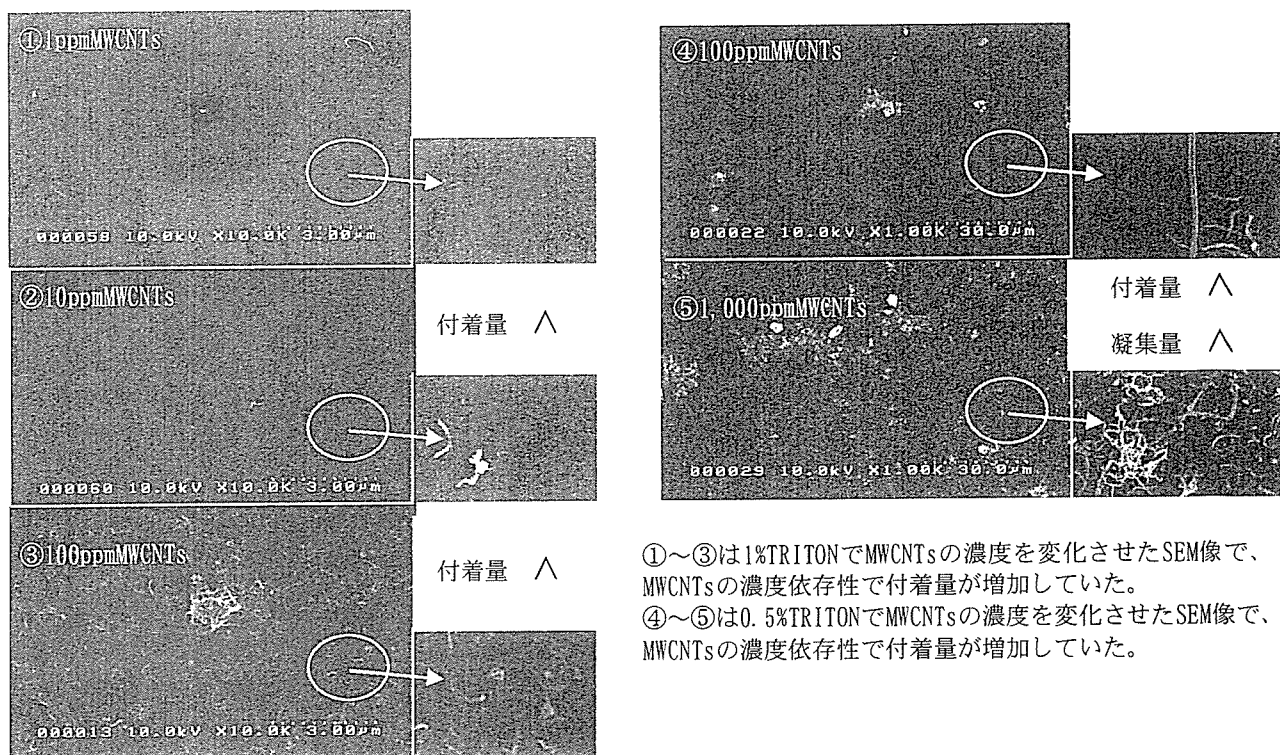
②SEMでの観察：通例に従い固定・臨界点乾燥を行い、SEM観察を行った。

③細胞付着性：コンフレントになるまで培養した状態で、トリプシン0.1%と0.02%のPBS溶液を2ccずつCNTコートディッシュと対照としてのコラーゲンディッシュに作用させ、細胞数の変化を経時的に観察した。

3. 結果

1. コーティング条件によるMWCNTsの付着状態の変化と最適コーティング条件を下記にまとめた。

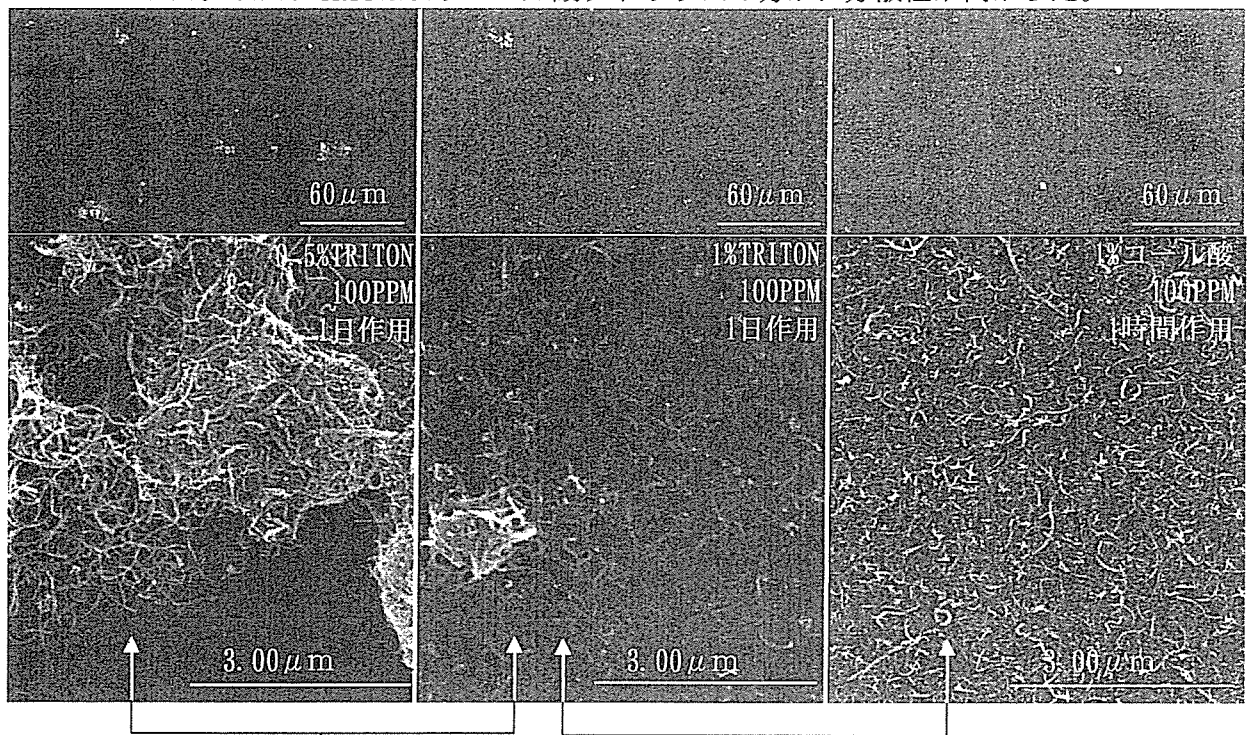
a) MWCNTsの濃度の影響：付着量も凝集体量も濃度依存性であった。濃度が濃くなれば付着量が多くなったが、凝集体も多くなった。



①~③は1%TRITONでMWCNTsの濃度を変化させたSEM像で、MWCNTsの濃度依存性で付着量が増加していた。
④~⑤は0.5%TRITONでMWCNTsの濃度を変化させたSEM像で、MWCNTsの濃度依存性で付着量が増加していた。

b) 界面活性剤の影響

界面活性剤は濃度が低いほど分散性が悪く凝集体が目立ち、コラーゲンへの付着が悪かった。また、TRITONよりコラーゲンの方が、分散性が高かった。

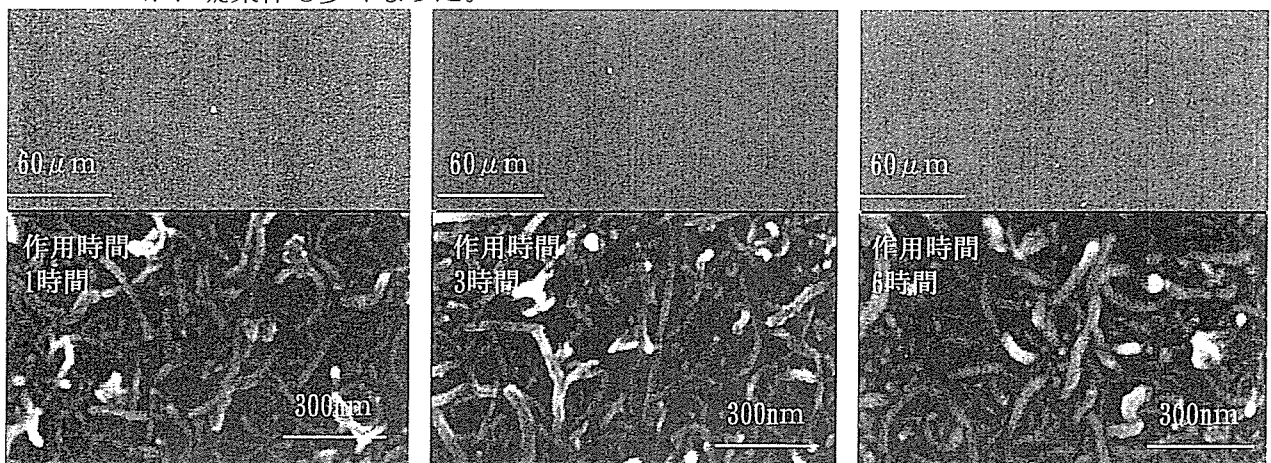


界面活性剤の濃度が低いほど凝集体ができやすく、付着量も少なかった。

作用時間に関わらず、TRITONよりもコラーゲンの方が、凝集体も少なく、付着量も多かった。

c) 作用時間の影響

付着量も凝集体量もほぼ時間依存性であった。作用時間が長くなれば付着量が多くなるが、凝集体も多くなった。



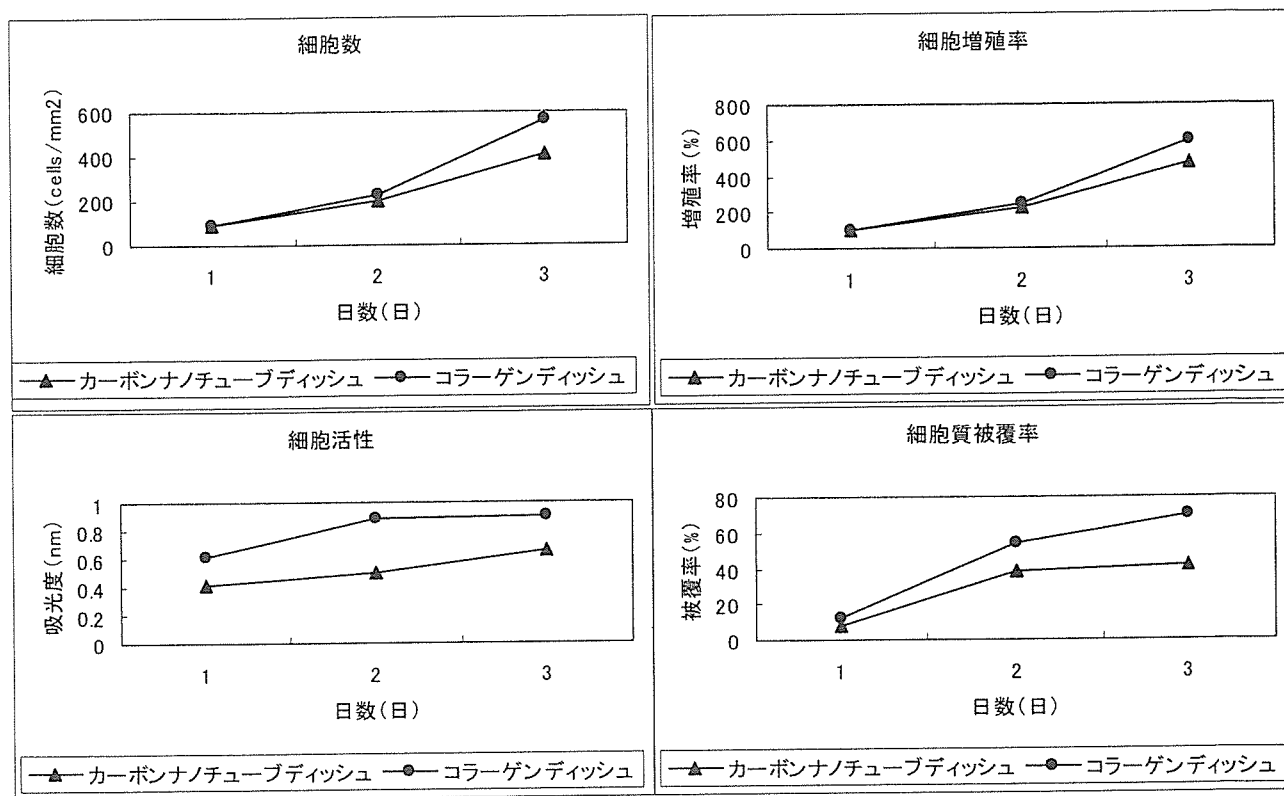
作用時間が長くなれば、MWCNTsが隙間なく密に付着するが、凝集体の量も増えた。

2. CNTコートディッシュ上での細胞培養試験の結果

a) 細胞増殖、細胞活性、細胞質被覆率

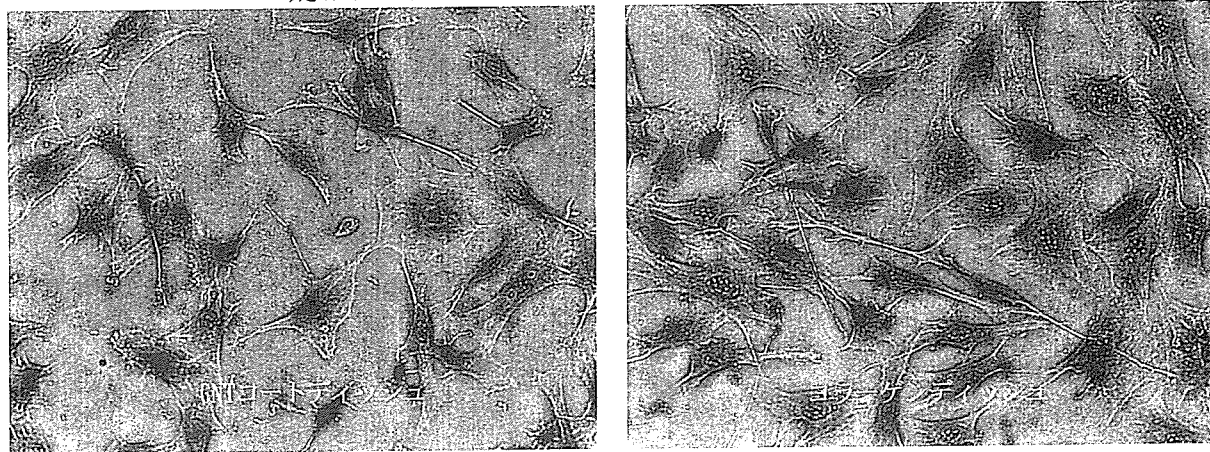
CNTコートディッシュでの細胞数と対照ディッシュでの細胞数はほぼ変わらなと思われ

た。しかし、CNTコートディッシュの細胞活性が対照ディッシュと比較して初期からやや活性が低く、細胞質被覆率も同様であった。

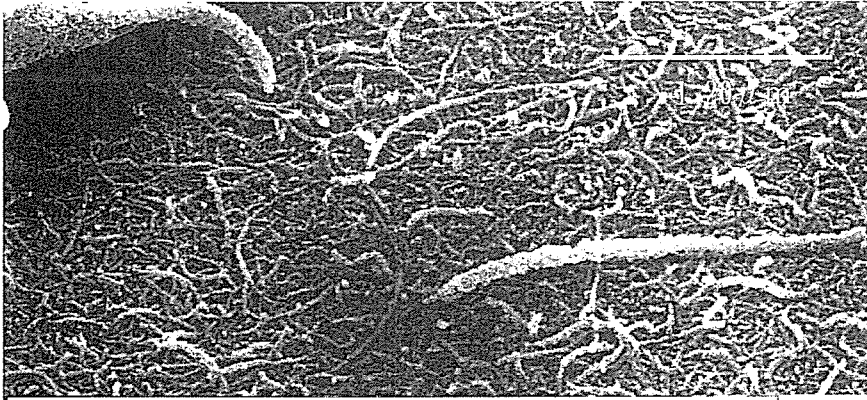


b) 細胞の形態

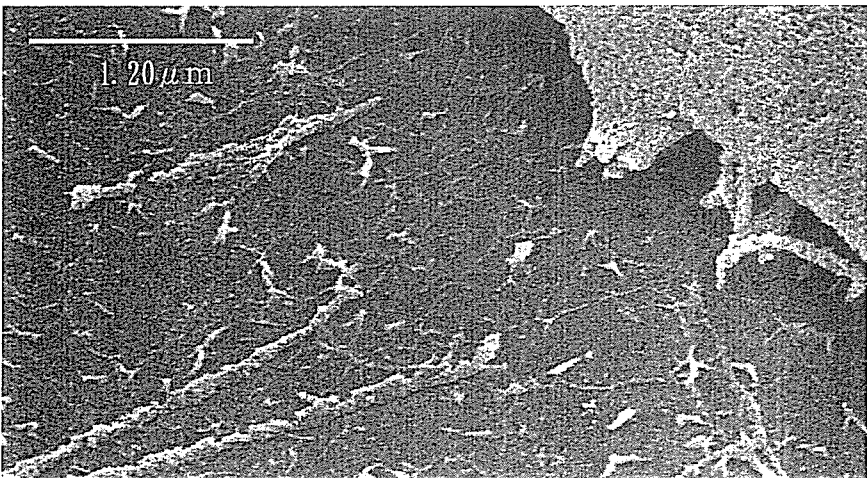
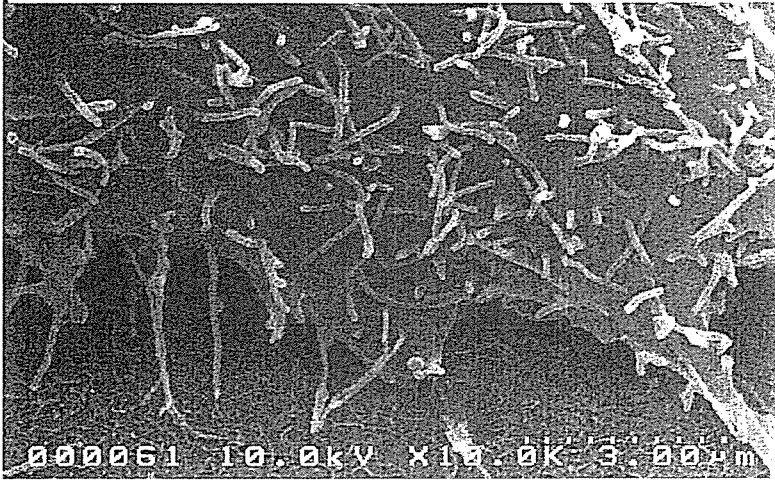
光学顕微鏡：CNTコートディッシュでの細胞は対照ディッシュの細胞と比較して細胞個数が少なく、細胞1個1個の大きさも小さかった。細胞被覆率との相関性が疑われた。



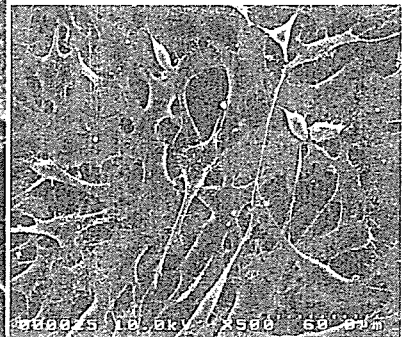
SEM像：光学顕微鏡と同様に、対照ディッシュの細胞と比較して細胞個数が少なく、細胞1個1個の大きさも小さく細長かった。また、細胞の体表に対照と比較して多くの偽足が出ていた。



CNTコートディッシュ

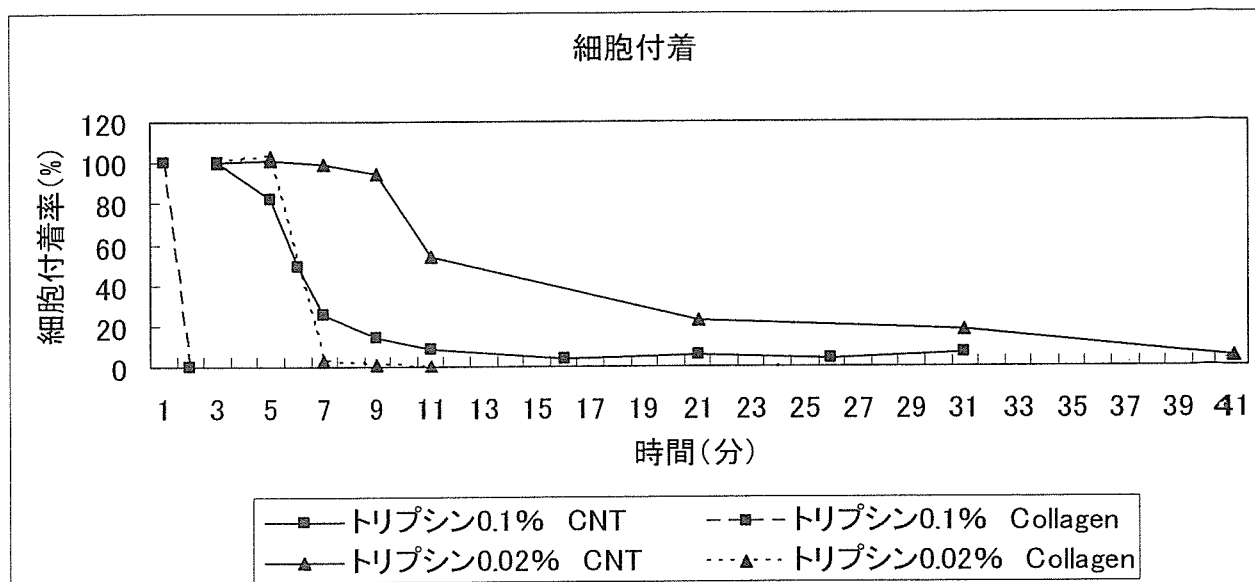


コラーゲンディッシュ



1) 細胞付着性試験

トリプシン0.1%、0.02%にて細胞の付着性を確認したところ、CNTコートディッシュ上のMC3T3-E1細胞の方が有意に高い付着性を示した。



4. まとめ

1. MWCNTsの分散性を高めることによりコラーゲンディッシュに付着し、界面活性剤の種類により凝集体が除去できることが分かった。1%コール酸に500℃×90分酸化処理し塩酸洗浄により精製させ水酸基を付加した100ppmMWCNTsを溶解した溶液が最適コーティング条件であることが判明した。
2. CNTコートディッシュでの細胞培養は細胞活性、細胞増殖率ともコラーゲンコートディッシュにやや劣るものの、ほぼ同等の細胞増殖能が認められ、細胞培養用担体として使用可能であることが分かった。
3. CNTコートディッシュ上の細胞は通常は細胞が剥離するトリプシン溶液でも剥離しにくく、高い細胞付着性を持つことが示された。

5. 今後の方針

今後は、上記CNTコートディッシュの細胞培養における特性を更に検討すると共に、他の材質（例えば金属など）へコラーゲンとMWCNTsの複合コーティングによる、培養担体やインプラントなどへの応用を検討する。

水分散ナノ粒子の製造と利用

○米澤 徹¹、鴨志田圭吾²、木下隆利²
東京大学 大学院理学系研究科 化学専攻¹
名古屋工業大学 大学院物質工学専攻²

Preparation and Application of Water-dispersed Nanoparticles

○Tetsu YONEZAWA, Keigo KAMOSHITA, and Takatoshi KINOSHITA

Graduate School of Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan

現代のナノテクノロジーにおける基幹材料の一つとして金属および金属酸化物のナノ粒子の研究が非常に盛んに行われている。特に、制御された大きさのナノ粒子の湿式調製は、大量のナノ粒子を安定に供給する手段として注目されてきている。¹⁾

湿式法でナノ粒子を調製するとき、対応した金属塩を還元して金属原子を発生させ、その原子の凝集を制御してナノ粒子を調製され（図1）、¹⁾ バイオセンシングなどに用いられる。²⁾ 本研究ではこの手法をまねて、磁性マグネタイト粒子を調製して、粉末回収することを試みた。

FeCl_3 を原料塩として、水素化ホウ素ナトリウムによって還元操作を行った。窒素置換せず大気雰囲気中で調整した。鉄イオンは一部還元され、結果的にマグネタイトが得られた。超常磁性体であって、ナノ粒子は磁石についていた。XRD、TEM、SQUID などを用いて得られたナノ粒子について分析した。ゼラチンの安定な保護能力と、金属塩溶液に添加する水素化ホウ素ナトリウムの還元力と、その添加による pH の上昇によって、微小かつ粒子径のそろったマグネタイトが安定に生成したものと理解される。

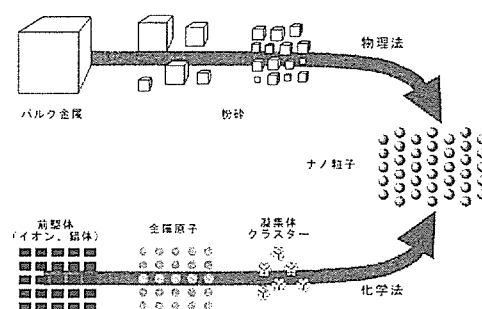


Figure 1. Schematic illustration of the preparative procedures of metal nanoparticles.

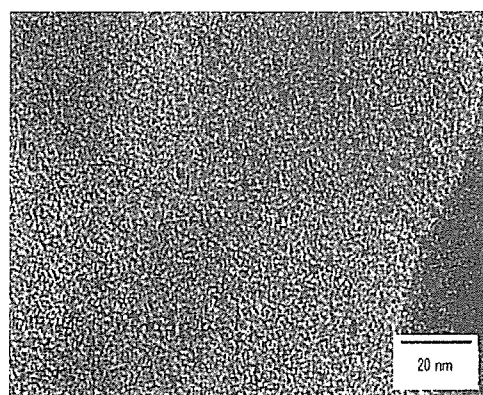


Figure 2. Transmission electron micrograph of gelatin-stabilized magnetite nanoparticles prepared from FeCl_3 .

【謝辞】本研究の遂行に的確なアドバイスを頂戴した東京大学 西原寛教授に感謝の意を表す。

【文献】1) 米澤徹監修「金属ナノ粒子の合成・調製、コントロール技術と応用展開」技術情報協会(2004). 2) 三浦佳子・米澤 徹, *Dojin News*, **113**, 1-8 (2005).

生体材料と細胞との界面相互作用

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

○岡崎 正之・平田伊佐雄

1. 生体親和性

生体組織はきわめて精巧で、巧みにレギュレートされている。理想的には、生体組織そのもので置き換えるのが良いのであるが、再生医療は、まだ始まったばかりである。やはり、現在のところ人工材料を使用せざると得ない。そうすると、いかに生体と“馴染み”のある生体親和性材料を開発するかということになる。それには、生体反応を十分理解する必要がある（図1）。

なかでも、免疫反応は生体防御系の中心的な役割を担っている異物反応の一つである。従来的人工材料では免疫反応は、それほど注目されて来なかったが、生体材料も組織工学の発展に伴い、より生体に近い生体由来のタンパク質や細胞を用いた療法が広がるにつれ、今後避けて通ることの出来ない生体反応として重視されつつある。

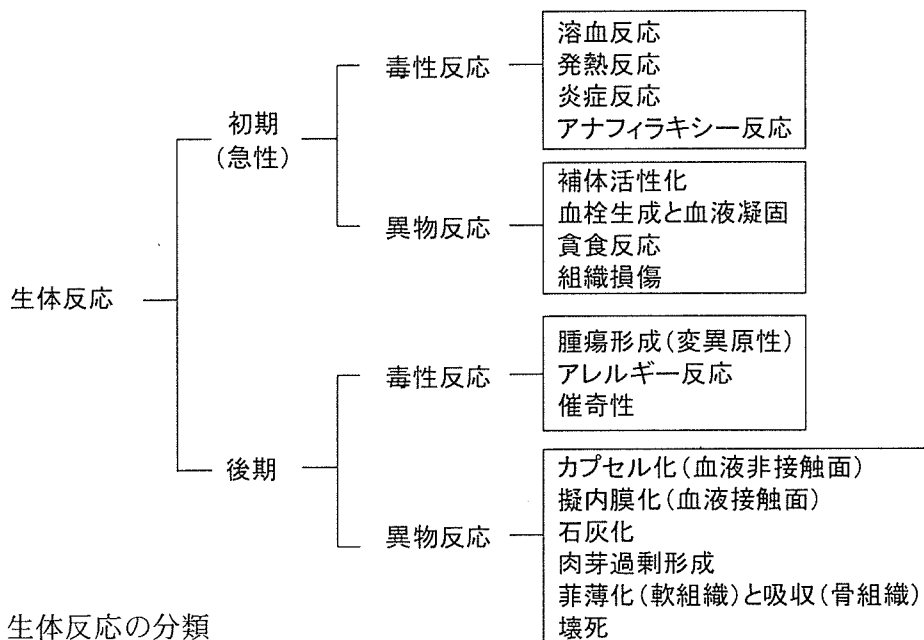


図1. 生体反応の分類

3. 細胞との相互作用

生体と人工材料（異物）との反応を考える場合には、細胞レベルでの界面反応を考えることが重要である（図2）。生体に接触した材料に対し最初に相互作用を示す生体成分としては、血液や粘液といった体液であり、それら体液中には多糖類やタンパク質、細胞が含まれる。その中で、材料表面に最初に接触して、その後の一連の生体反応に重要な役割を演ずるのはタンパク質である。次に起こるのが、細胞付着であり、細胞膜上のレセプターを介して吸着タンパク質と特異的に結合するものと考えられる。この際に、種々の生体反応が生じ、特に発熱反応や炎症反応がよく起こる。