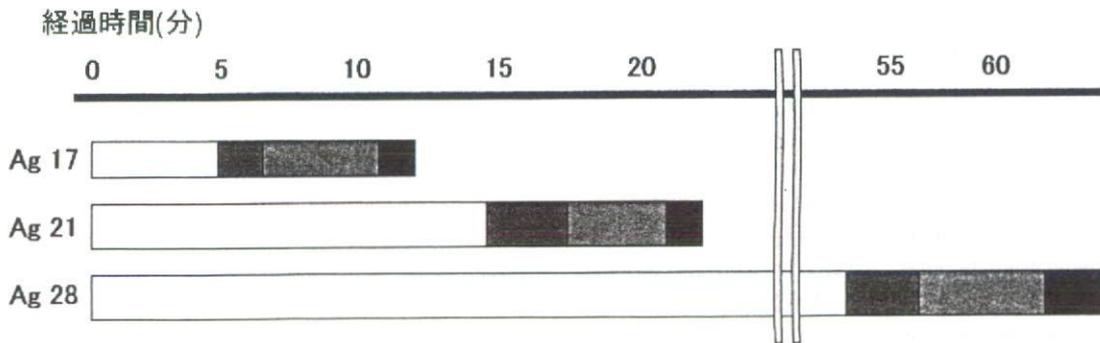


図1 ゾウリムシを用いた細胞毒性試験の概要
各粒子の毒性試験は上図に記す試験番号に従って行った。



- 回転・方向転換** : 細胞の長軸に沿った回転運動と前進遊泳の方向が頻繁に変化する行動。
- 変形** : 細胞の長軸が短縮し、尾部の先端部が細く変形した状態(Fig. 8 B 参照)。
- 後退遊泳** : 繊毛運動の逆転による尾部を先頭にした遊泳行動。
- 細胞死** : 繊毛運動や収縮胞などの細胞活動の停止を伴う細胞死。

図 2-1 Ag 粒子分散液中での遊泳行動と細胞形態の変化

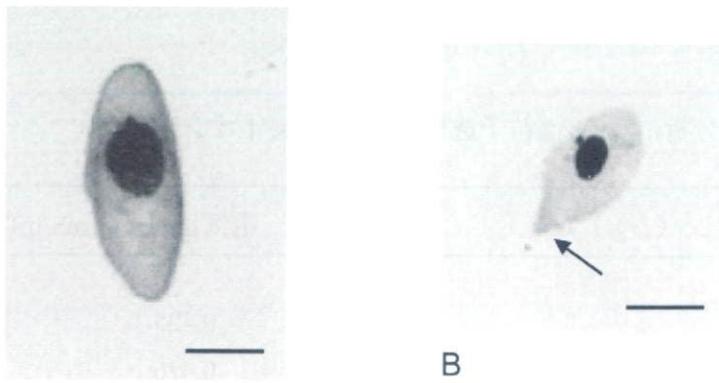


図 2-2 Ag 粒子分散液中での細胞の形態変化
 A: コントロール細胞、B: Ag 粒子分散液中での死細胞。バーは 50 μ m。

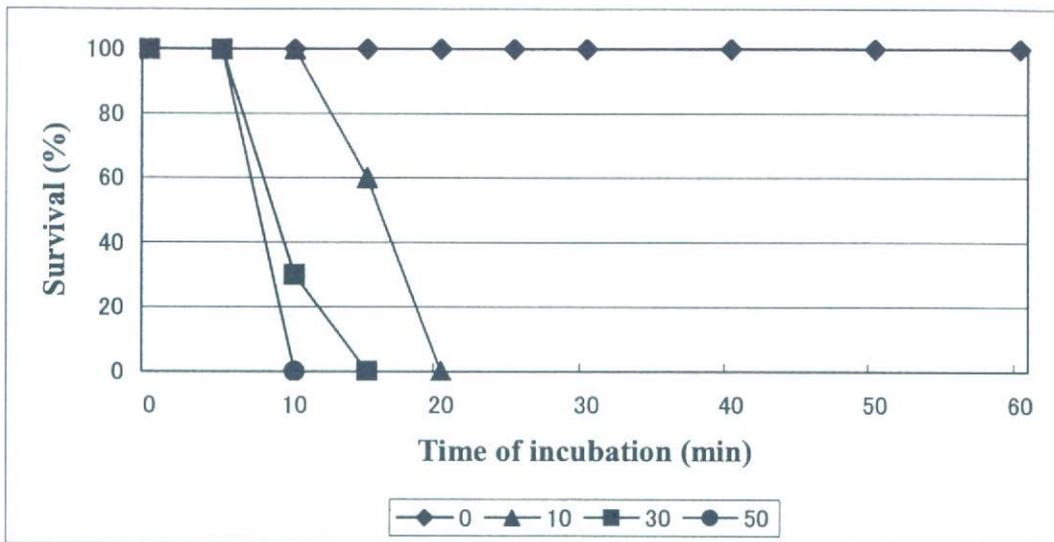


図 3-1 平均粒径 17 nm の Ag 粒子分散液中での生存曲線
 データは 2 回の実験の平均値をプロットした。

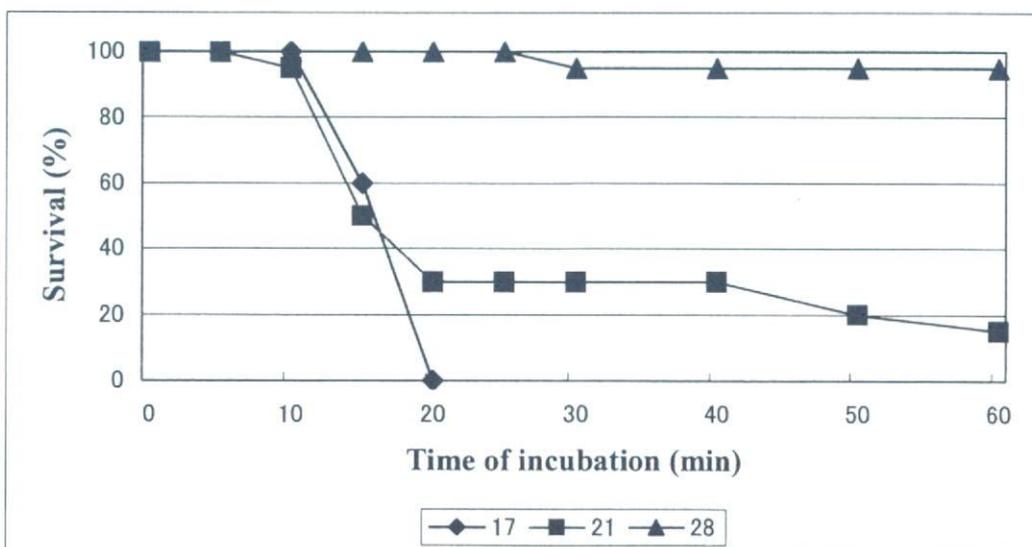


図 3-2 平均粒径の異なる 3 種類の Ag 粒子の生存曲線
 分散度 10 μ g/ml に調製した Ag 粒子分散液を用いた。データは 2 回の実験の平均値をプロットした。

表1 誘導結合プラズマ質量分析による Ag 粒子透析外液中の Ag イオンの測定

Ag 粒子	Ag イオン ($\mu\text{g/L}$)	pH	電気伝導度 (mS/m)
Ag 21	23	5.1	0.425
Ag 28	24	5.0	0.426

表2 CoFe_2O_4 及び TiO_2 の有性生殖(接合)に対する影響

稔性	処理時期	細胞数	対照群	TiO_2	CoFe_2O_4
高い系	前期	192	100	88.2	101.3
	後期	96	100	81.3	106.3
低い系	前期	232	100	124.8	89.9
	後期	70	100 ^a	45.5 ^{ab}	0 ^b

表中のアルファベットは異符号間で $P < 0.001$ で有意差があることを示す (Dunnett による多重比較)。

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

ゾウリムシのX線顕微鏡による観察—II

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	矢田慶治	株式会社東研X線開発部
研究協力者	斎藤 泰	株式会社東研X線開発部
研究協力者	芳賀信幸	石巻専修大学理工学部生物生産工学科教授
研究協力者	阿部大基	石巻専修大学理学研究科生命科学専攻大学院生

研究要旨 本研究においては、分解能が 0.1 ミクロン程度のX線顕微鏡でゾウリムシを観察し、在来行われてきた光学顕微鏡及び走査電子顕微鏡（SEM）による知見との比較を行った。試料は通常の方法で培養したゾウリムシを自然乾燥したものと、グルタルアルデヒドもしくはオスミウム酸で固定後臨界点乾燥もしくは凍結乾燥したもので、両者の間には、SEM 像のみならず、X線像に大きな差異が見られた。特徴的なことを列挙する。（1）自然乾燥試料のX線像は極めてコントラストが悪いが、1.04 nm の $L\alpha$ 線を出す Ge ターゲットを使うと内部構造及び繊毛を認めることが出来た。しかし、自然乾燥に伴う扁平化のため、極めて不満足な像である。（2）グルタルアルデヒドもしくはオスミウム酸で固定後臨界点乾燥や凍結乾燥をした試料では、形態がよく保存され、SEM で網目状体表面構造、繊毛等が綺麗に観察された。（3）これら固定をした試料のX線像ではコントラストが向上し、特にオスミウム酸固定では Au ターゲットを使用しても十分な程度のコントラストがつく。（4）X線像では体表面の網目構造及び繊毛にコントラストがあまりつかないが、それに代わって、オスミウム酸固定の場合には特に、光学顕微鏡では認められないトリコシスト（毛胞）と思われる構造が見られた。（5）内部器官の存在が明確に認められた。

A. 研究目的

ゾウリムシは、細胞生理学的な研究に非常に適した材料で、今まで光学顕微鏡、透過型及び走査型電子顕微鏡などで多くの研究が行われてきた。これらの観察法は夫々特徴を持つが、そのうち生きたまま動的な観察が出来るのは光学顕微鏡法だけである。最近 X線投影顕微鏡の分解能がサブミクロンに達し、更にナノメータまで改善されつつある。十分なコントラストを付けることができれば相補的な興味ある知見が期待でき、光顕よ

りも良い分解能での動的観察も最終目標として考えられるので、その第1歩としてゾウリムシの観察を行った結果を報告する。

B. 研究方法

用いたゾウリムシ (*Paramecium Caudatum*) は以下の3種類の試料を用意した：1) 通常の方法で培養し自然乾燥をしたもの、2) 培養後グルタルアルデヒド(5%)もしくはオスミウム酸で固定、乾燥したもの。固定した場合の乾

燥には、臨界点乾燥、もしくは凍結乾燥を用いた。臨界点乾燥はよく知られた定法によった。凍結乾燥は、固定後 t-ブチルアルコールで置換し、真空排気によって凍結気化する方法を採った。これらの試料は電顕用のメッシュ (100 メッシュ程度) に PVF 膜を張り、カーボンコートをし、極少量の接着剤を付けてから実体顕微鏡下で張り付けたものを観察した。観察には 0.1 ミクロンの分解能を持つ X 線顕微鏡 TUX-5000F と X 線顕微鏡としても使える走査型電顕 DS-130 を用いた。走査電顕として観察する場合は電子線によるチャージングを避けるために予め薄くカーボンを蒸着した。

C. 研究結果

図 1 は自然乾燥をした試料を SEM で電圧を 4kV, 5kV, 6kV, 15kV と変えて観察した像である。加速電圧によって見え方が著しく変わることが判るが、表面構造に関しては 5-6 kV が適しており、体周辺に多数の繊毛が見られる。15 kV 以上に上げると内部構造が見られるようになることが判る。図 2 は 5kV で撮った SEM 像を拡大して示す。表面構造と繊毛がよく見られるが、自然乾燥に伴う収縮のため、体表面と繊毛の間に間隙が出来ていることが判る。図 3 は、同じ個体の X 線像と光学象を較べたものである。X 線像は Ge ターゲットを用い 10kV で撮っているので 1.04nm の Ge $L\alpha$ 線が優位で、かなりコントラストがつく条件であるにもかかわらず実際のコントラストは極めて悪い。しかし、内部構造と思われる透けた丸い構造は SEM とも LM ともよく対応している。このことは自然乾燥で扁平化したために細かい構造のコントラストが出ないことを暗示している[1]。そこで次に固定してから臨界点乾燥、もしくは凍結乾燥を試みた。固定にはオスミウム酸とグルタルアルデヒドの 2 種類を用いた。

1 オスミウム固定の場合

図 4 は、オスミウム酸固定後 t-ブチルアルコールで置換し、凍結乾燥をした試料の SEM 像で左右 2 つの像は 10 度傾けたステレオ像である。

図 5 は同じ個体の中央部分を拡大して撮影したステレオ像である。表面の網目状構造と繊毛の様子が立体的に観察できる。図 6 は、図 4 と同じ個体の X 線像でその下部に対応したステレオ像である。特徴として言える事は、SEM 像に見られた表面の網目構造と繊毛がはっきり見えないで代わりに短い繊維状の構造が一面に見えること、内部器官と思われる核のような構造が見えることである。図 7 は同じくオスミウム酸固定で凍結乾燥をした個体の X 線像であるが同様に網目構造の代わりに繊維状構造と内部器官が見られる。

2 グルタルアルデヒド固定の場合

図 8 はグルタルアルデヒド固定後凍結乾燥をした試料のステレオ SEM 像である。低倍率像とその一部を拡大した像を並べてあるが、立体視には横から見てもらいたい。体表面の網目構造と繊毛が綺麗に見られ、繊毛が矩形をした土手の中から生えていることがよく判る。図 9 は同じ個体の X 線像である。オスミウム酸固定のものに比べ、コントラストが低い、表面の網目構造がうすく見られ、また内部器官も見られる。一方、オスミウム酸固定で見られた短い繊維状構造はそれ程明瞭でない。

D. 考察

ゾウリムシを自然乾燥して試料とした場合、SEM 観察、X 線顕微鏡観察とも明瞭な像が得られないが、オスミウム酸もしくはグルタルアルデヒドで固定すると表面並びに内部とも構造がよく保存され、Ge ターゲットより硬い X 線を出す Au ターゲットでも十分な程度のコントラストが得られる事がわかった。これは筆者がウニの卵を X 線顕微鏡で観察した時と同様な知見である[1]。しかし、固定液による X 線像の違いも見られた。即ち、オスミウム酸固定の試料の X 線像では表面の網目構造及び繊毛は観察されず、細い繊維構造が現れる。この構造を検討した結果、筆者は蛋白質から成るトリコシスト(毛胞)[2]がオスミウム酸で固定のみならず染色の作用を受けて X 線像に強いコントラストを与えたものではないかと考えている。在来、トリコシストは電顕で観察され、

光顕では特殊な色素で染色して観察されていたが、今回X線顕微鏡で始めて観察されたものと思われる。グルタルアルデヒド固定は、X線像でのコントラストは少し弱い。細部の構造はオスミウム酸固定よりもよく保存されているように思われるので、今後Geターゲットでコントラストをつけること或いはグルタルアルデヒドとオスミウム酸との2重固定をすることが有効であるように思われる。また、内部器官観察にはCT観察も有望であると思われる。

E. 結論

1. オスミウム酸もしくはグルタルアルデヒドでゾウリムシを固定してから、臨界点乾燥もしくは凍結乾燥を行った。
2. SEM観察から、どちらの固定法でも表面構造がよく保存される。
3. X線像からは、SEM像とかなり異なる構造が見られ、特にオスミウム酸固定の場合、細胞膜の下にあるトリコシスト(毛胞)がみられる。また、内部器官が観察された。

4. オスミウム固定では十分なコントラストが得られるので、今後内部器官観察にCT観察が有望であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. K.Yada,K.Shinohara,Y.Hamaguchi, Proc. 5th Internat.Cnf. XRM Wurtzburg, Germany1996 II-255
2. ゾウリムシの遺伝学 樋渡宏一編 東北大学出版会 春本晃江「トリコシストの機能と遺伝」pp132-135,1999

2. 学会発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

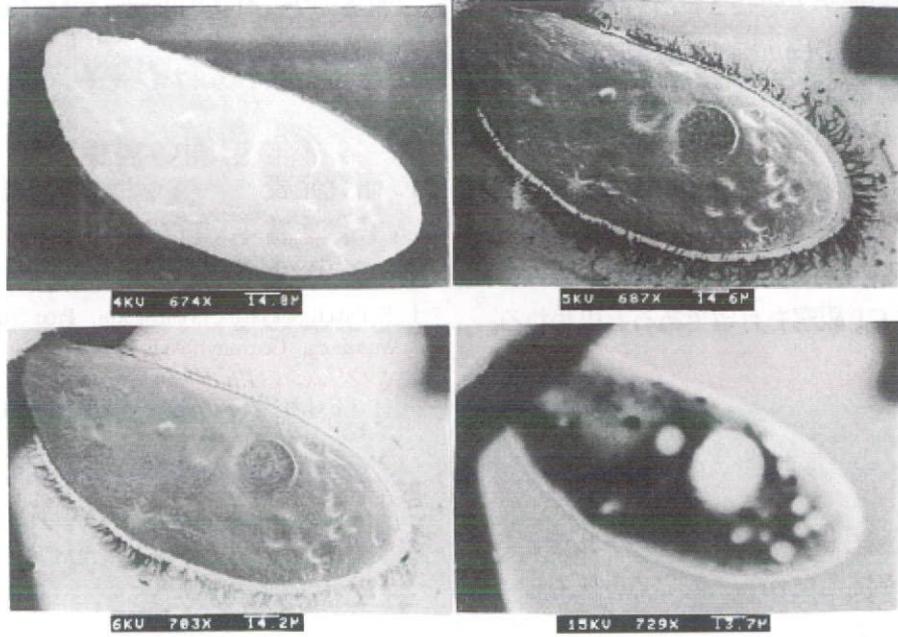
1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

無し

SEM images of *Paramecium caudatum*



☒ 1



☒ 2

X-ray image Ge 10kV

LM image



☒ 3

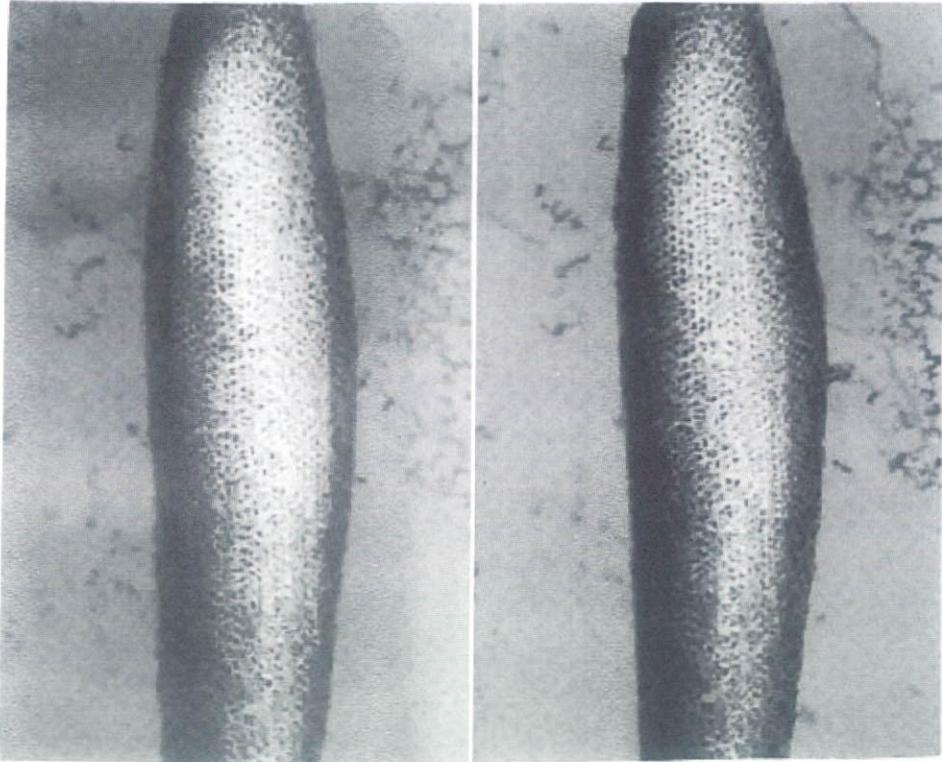


图 4

Paramecium : OsO₄ fix. + F.D.

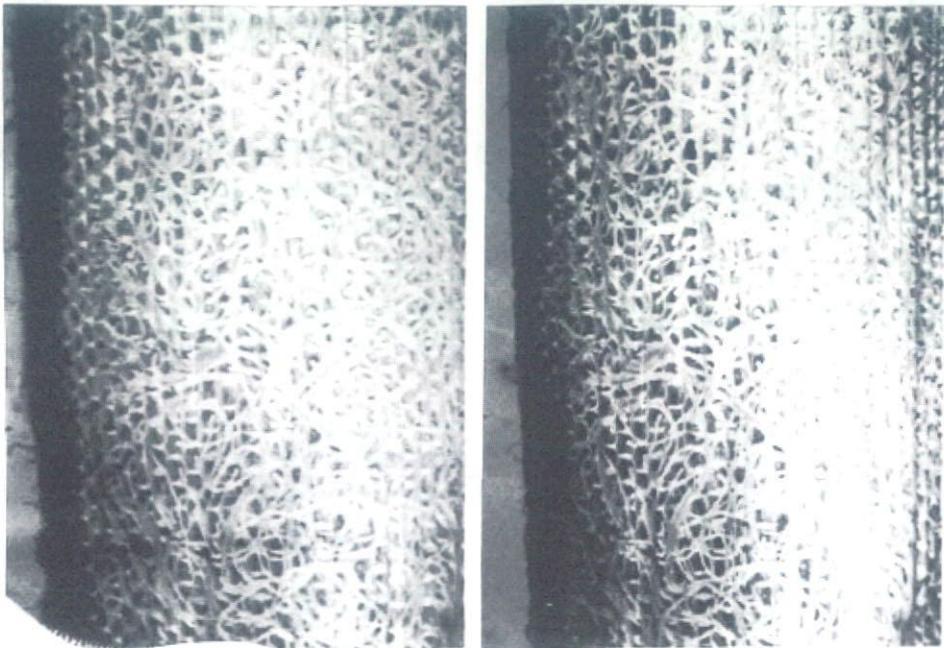


图 5

Paramecium :OsO₄ fix.+ critical point drying



图 6

Paramecium :OsO₄ fix.+ freeze drying

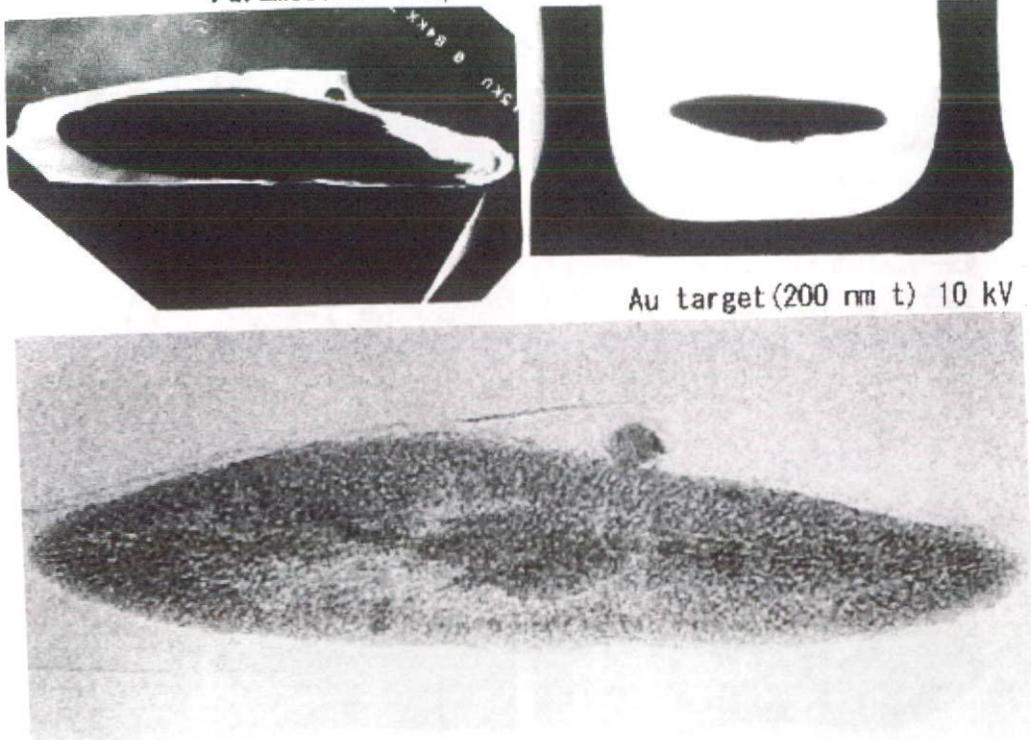
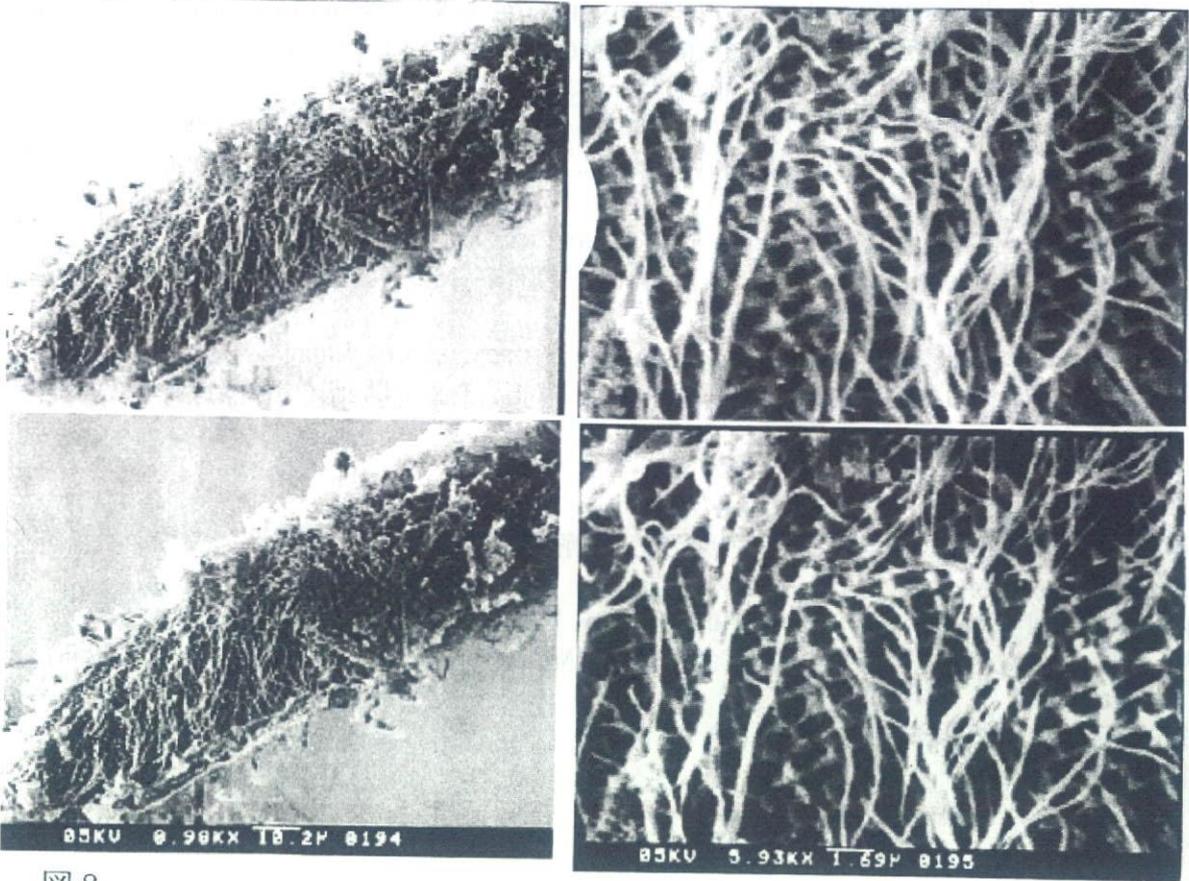


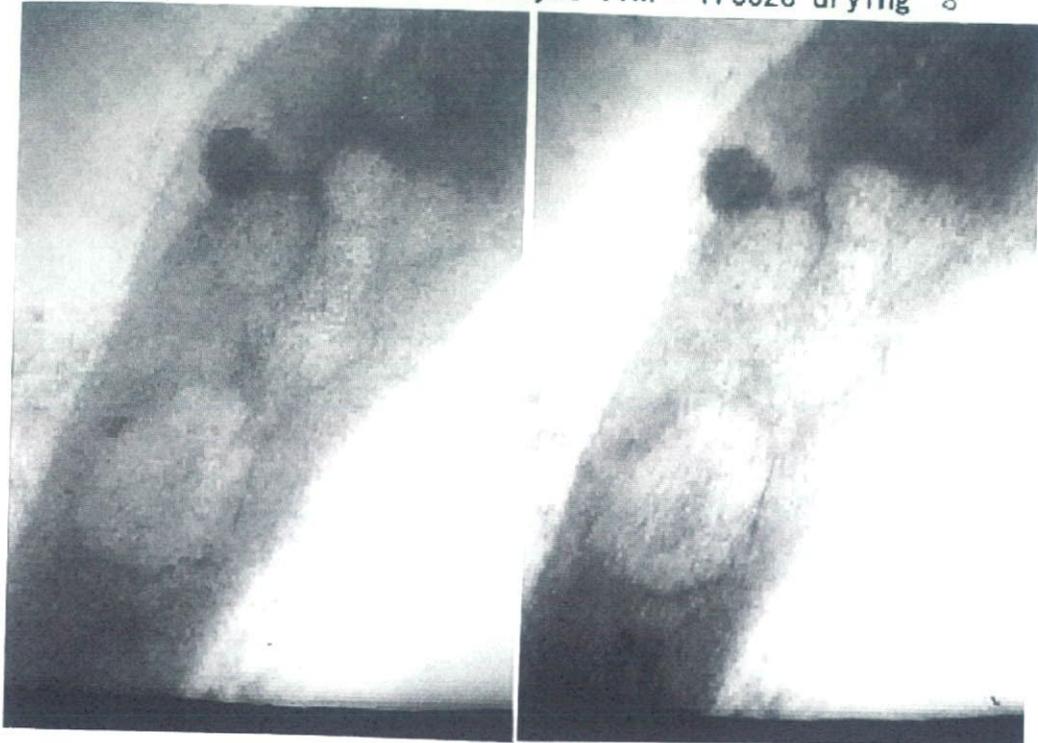
图 7

Paramecium :glutaraldehyde fix.+ freeze drying



☒ 8

Paramecium :glutaraldehyde fix.+ freeze drying 3"



☒ 9

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Saito, H. Kai, and K. Yada “High Resolution X-Ray Inspection Microscope Equipped with a Field Emission Gun and Its Application” Proc. 8th Int. Conf. X-Ray Microscopy (2005) Himeji, IPAP Conf. Series 7 pp. 35-37
2. K. Yada, A. Ito and Y. Kinjyo “New Type of Targets for Projection X-Ray Microscopy of Samples consisting of Lighter Elements” Proc. 8th Int. Conf. X-Ray Microscopy (2005) Himeji, IPAP Conf. series 7 pp. 143-144
3. K. Oohashi, K. Yada, K. Shirota, H. Kai and Y. Saito “Low-Voltage Projection X-Ray Microscope for Inspection of Lighter Elements” Proc. 16th Int. Micros. Conf. (2006) Sapporo, p. 1046
4. K. Yada “Recent Trends of Projection X-Ray Microscopy in Japan” Proc. 19th Int. Conf. X-Ray Optics and Microanalysis and 43rd Annual Conf. X-Ray Chemical Analysis (2007) Kyoto, Elsevier in press

2. 学会発表

1. 齋藤 泰、甲斐廣海、代田畊平、矢田慶治 “分解能 0.1 μ m 以下超高分解能 X 線顕微検査装置” 第 68 回応用物理学会学術講演会予稿集 No. 2, P. 714 北海道工業大学 2007
2. 南 勝利、小口征男、矢田慶治 “低加速電圧 X 線顕微鏡による軽元素から成るサンプルの観察” 第 68 回応用物理学会学術講演会予稿集 No. 2, P. 714 北海道工業大学 2007

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請中
2 件
2. 実用新案
無し

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

細胞培養におけるカーボンナノチューブ膜の影響

主任研究者	亘理 文夫	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准教授
研究協力者	赤坂 司	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	阿部 薫明	北海道大学歯学研究科助教

研究要旨 本研究においては、ナノ微粒子としてカーボンナノチューブに注目し、カーボンナノチューブ膜および細胞培養用ポリスチレンディッシュ表面にカーボンナノチューブ薄膜を作製し、ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞 (SaOs2) を用いて細胞培養に対するカーボンナノチューブの影響を検討した。

その結果、SaOs2 はカーボンナノチューブ膜上において一般的な培養条件にて良好な細胞接着および細胞増殖を示した。細胞接着では、細胞培養用ディッシュに対し単層カーボンナノチューブ (SWNTs, 0.9 倍)、多層カーボンナノチューブ (MWNTs, 1.3 倍) といずれも強い細胞接着性を示した。また細胞増殖においても同様に SWNTs (1.2 倍)、MWNTs (0.8 倍) と良好な増殖を示した。特に毒性の影響が強く現れることが知られている低血清培地においては SWNTs 上にて顕著な増殖促進効果 (3.3 倍) を示した。同様に MWNTs (1.0 倍) においても良好な増殖を示し、カーボンナノチューブは細胞毒性を示さず、逆に増殖促進効果などの有益な影響を細胞に与えることが分かった。

以上の結果より、カーボンナノチューブをろ過膜や基材表面へ固定した形態においては、骨芽細胞様細胞に対して細胞毒性を示さず、逆に細胞培養に対して良好な影響を与えることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、最も注目されている材料の1つにカーボンナノチューブ (CNT) が挙げられ、エレクトロニクス分野やエネルギー分野を中心に集中的な研究が進行中である。一方で、CNT のバイオ分野への応用研究も開始されており、AFM の探針、タンパク質の結晶化、バイオセンサーへの応用が注目を集めている。我々の研究グループでは、世界に先駆けカーボンナノチューブ膜を細胞培養のスキヤホールドとして使用し、骨芽細胞様細胞 (SaOs2) の培養を検討したところ、①良好な細胞増殖、②強い細胞接着、③細胞の進展、④トリプシンによる細胞剥離の耐性、⑤細胞

の仮足とカーボンナノチューブの絡み合い、⑥アルカリフォスファターゼ活性の向上など興味ある特性を見出した。以上の細胞培養におけるカーボンナノチューブの特性は本来の利点や特性の一部であると推測され、カーボンナノチューブの毒性とともにさらなる詳細な検討が望まれている。

本研究では、ナノ微粒子としてカーボンナノチューブを取り上げ、カーボンナノチューブ膜および細胞培養用ポリスチレンディッシュ表面にカーボンナノチューブ薄膜を作製し、骨芽細胞様細胞 (SaOs2) を用いて細胞培養に対するカーボンナノチューブの影響を検討した。

B. 研究方法

カーボンナノチューブは、精製度の高い単層カーボンナノチューブ（純度 90%以上、名城ナノカーボン製 FH-P）および 6N 塩酸にて精製した多層カーボンナノチューブ（純度 80%以上、NanoLab 製）を使用した。

カーボンナノチューブ膜は、200 μ g CNTs/100mL の分散液を十分に超音波処理し、吸引濾過装置を用いてポリカーボネートろ過膜 (0.2 μ m, Advantec) 上にろ過して膜を形成させた。得られた膜を 6cm ポリスチレンディッシュ (for cell culture, Corning 社製) へ固着させ、その後、乾燥、UV 滅菌し培養に使用した。

カーボンナノチューブ薄膜は、CNTs 分散液を 6cm のポリスチレンディッシュ (for suspension culture, Corning 社製) に薄層コートし作製した。その後、乾燥、UV 滅菌し培養に使用した。

使用した細胞はヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞である SaOs2 を用い、DMEM に 10%FBS および 1%PSN を添加した培地にて、37 $^{\circ}$ C で 5%CO₂ 環境下にて増殖させ、対数増殖期にある細胞をトリプシン処理により回収し、細胞接着および細胞増殖試験に使用した。

細胞接着試験は、カーボンナノチューブ膜に対して、SaOs2 細胞 (5×10^5 個/dish) を播種し、DMEM に 10%FBS および 1%PSN を添加した培地にて、37 $^{\circ}$ C で 5%CO₂ 環境下にて所定時間、インキュベートした。その後、PBS にて洗浄し、グルタルアルデヒドによる固定を行い、付着した細胞数を測定した。

細胞増殖試験は、カーボンナノチューブ薄膜に対して、SaOs2 細胞 (1×10^4 個/dish) を播種し、DMEM に 10%FBS および 1%PSN を添加した培地にて、37 $^{\circ}$ C で 5%CO₂ 環境下にて所定時間培養を行った。その後、PBS にて洗浄し、グルタルアルデヒドによる固定を行い、付着している細胞数を測定した。

細胞数は走査型電子顕微鏡 (SEM) 下または光学顕微鏡 (ギムザ染色) にてのカウント、または DNA 定量により行った。

細胞形態の観察には、培養後、PBS にて洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド、オスミウム酸による二重固定した。その後、エタノールによる段階的脱水を行い、臨界点乾燥にて乾燥させた。走査型顕微鏡にて観察するため、Pt-Pd により表面コートした。

低血清培地による増殖率の検討は、SaOs2 細胞 (1×10^4 個/dish) を播種し、DMEM に 1%FBS および 1%PSN を添加した培地にて、37 $^{\circ}$ C で 5%CO₂ 環境下にて所定時間、増殖が一番早いサンプルで 50%-70%コンフルエントになるまでインキュベートした。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

カーボンナノチューブ膜および薄膜の巨視的な観察結果 (図 1) および走査型電子顕微鏡による観察結果 (図 2) を示した。巨視的な観察では、カーボンナノチューブ膜は、黒色を呈しているのに対し、カーボンナノチューブ薄膜では透明性が高く、SWNT10 (10 μ g/dish) では透明度損失率は 3%程度であった。走査型電子顕微鏡観察では、カーボンナノチューブ薄膜である SWNT10 は表面にカーボンナノチューブバンドルのネットワークを形成するコート量であるのに対し、SWNT100 (100 μ g/dish) はほぼ一面が覆われるコート量、カーボンナノチューブ膜である SWNT200 (200 μ g/dish) では SWNT の層が重なったものであることが分かった。

ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞 (SaOs2) を用いたカーボンナノチューブ膜への細胞接着試験の結果 (図 4)、SWNTs 膜および MWNTs 膜へ強い接着性を示した。接着細胞数における経時変化を細胞培養用ディッシュ (Culture PS) と比較したところ、3 時間後において SWNTs では 0.9 倍、MWNTs では 1.3 倍であった。また、接触初期付近 (1 時間) では SWNTs および MWNTs において接着細胞数が多く 3 時間で減少する変化が観察された。

カーボンナノチューブ薄膜の細胞培養に対するコート量の影響を検討するため、SWNTs および MWNTs にて 1 μ g/dish から 100 μ g/dish の範囲内にてカーボンナノチューブ薄膜を作製し、細胞増殖率で比較検討を行った。増殖率は細胞培養用ポリスチレンディッシュを基準とした相対増殖率を示した (図 5)。その結果、SWNTs および MWNTs の両方でコート量 10 μ g/dish まで急激な増殖率の上昇が観察されたのに対し、10 μ g/dish 以上では飽和または緩やかな増殖率の増加を示した。コート量 10 μ g/dish で比較す

ると SWNTs では 1.2 倍と高い値を示し、MWNTs では 0.8 倍を示した。

カーボンナノチューブ薄膜上で培養した細胞の SEM にて観察した。MWNTs 上での観察結果を図 6 に示し、SWNTs 上での観察結果を図 7 に示した。細胞の仮足は SWNT 薄膜上では SWNT バンドル上に乗っている様子が観察されたのに対し、MWNT 薄膜では一部がカールした MWNT 繊維に潜り込む様子が観察された。

次に、カーボンナノチューブの特徴を見出すため、低血清培地にて SaOs2 を培養したときの増殖細胞数を図 8 に示した。その結果、SWNTs では細胞培養用ディッシュに対し 3.3 倍の増殖促進効果、MWNTs では 1.0 倍と同等の増殖率を示した。特に、SWNT 薄膜では他の比較材料に比べて顕著な効果が表れた。

D. 考察

本研究では、カーボンナノチューブをナノ微粒子の一つとして考え、固体表面状にカーボンナノチューブを固定した場合の細胞培養への影響を検討することを目的として、カーボンナノチューブ膜およびカーボンナノチューブ薄膜を調製した。

カーボンナノチューブ膜は、カーボンナノチューブの分散液を調製し吸引濾過によりポリカーボネート膜上に残渣としてカーボンナノチューブをろ別し、そのファンデルワールス力によるカーボンナノチューブ同士の凝集力により膜状に成型する方法である。比較的、多量のカーボンナノチューブを容易に成膜できることより、厚いカーボンナノチューブの層を形成するには向いている方法であるが、一部含まれる凝集体も積み重なり蓄積するため表面の凹凸が顕著となる特徴もある。また、カーボンナノチューブの積層が光を吸収してしまうため、黒色を呈する。

一方、カーボンナノチューブ薄膜は、カーボンナノチューブの分散液でポリスチレンディッシュ表面を薄層コートするが、カーボンナノチューブはファンデルワールス力にてポリスチレン表面に固着される。比較的、少量のカーボンナノチューブコートに有利である。また、光の透過性も良く透明度も高い。SEM 観察では、土台となるポリスチレンディッシュが平坦面であること SWNT が柔軟性を持つことにより、コート表面もバンドル最大直径 200nm 以下のナノレベルで平坦であった。また、バンドル直径が

200nm 以下であるため光の透過性が高く、また、全面を覆っていないネットワーク構造であるため SWNT10 では透明度損失率が 3%と透明導電性薄膜の性質を十分持つことが分かった。

カーボンナノチューブ膜での細胞接着試験(図 4)では、インキュベート後 3 時間で MWNT が最も接着数が多く、次に細胞培養用ディッシュ、SWNT の順であった。MWNT の強い細胞接着はカーボンナノチューブ自身の吸着力の強さに加え、MWNT の特徴的なナノの構造によるコート表面の凹凸に由来すると考えられる。また、SWNT と MWNT はインキュベート後 1 時間において一時的に高い接着数が観察された。これは機構や再現性は十分検討していないが、細胞による拒絶反応のような反応を示し、3 時間後には許容され安定した接着性を示すと考えられた。

細胞増殖率を検討した結果(図 5)、SWNT および MWNT は良好な増殖率を示した。コート量の影響を検討した結果、10 μ g/dish と少量のカーボンナノチューブにて良好な増殖率を示すことが明らかとなった。このことより、細胞はディッシュ表面のすべてを認識しているのではなく一部を認識し、ディッシュ表面を覆い尽くす量のカーボンナノチューブが必要でないことを示していると考えられる。逆に多すぎるコート量は表面に凝集体やナノチューブの重なりによる凹凸を形成させてしまう可能性が高くなり、細胞増殖に不利に働いてしまうことも考えられる。コート量が多いことは導電性を向上させる効果もあるが、透明度を下げる欠点もあり、適度な表面コートが高い増殖率をもたらすと推測された。細胞培養用ポリスチレンディッシュと比較しても、SWNT10 で 1.2 倍、MWNT10 で 0.8 倍であり、SWNT では増殖率が高く広く一般的に使用されている細胞培養用ポリスチレンディッシュを超える増殖率が観察された。高い増殖率は、カーボンナノチューブの持つナノレベルでの凹凸および高いタンパク質吸着能が細胞増殖に有利に働くためと考えられる。以上より、表面に固定したカーボンナノチューブは細胞増殖に対して有利に働くことが明らかとなった。

カーボンナノチューブ薄膜上で培養した細胞を詳細な SEM 観察の結果(図 6、7)、SWNT 上に細胞の仮足が乗っている様子が観察されたのに対し、MWNT 上では MWNT のカールした繊維に潜り込む、または絡み合う様子が観察された。MWNT 繊維への仮足の絡み

合いは細胞接着に有利に働くとともに、細胞増殖に対しては抑制する効果があると考えられる。また、MWNTによる表面修飾は容易にカールした表面構造や、突起を形成させることができることから、MWNTの大きな特徴の一つになると考えられる。

再生医療やバイオ分野において、低血清培地での効率的な細胞培養は、BSE問題やコスト削減、細胞機能の制御の点で望まれている。そこで、カーボンナノチューブ薄膜における低血清培地での培養を検討した。

1%FBSにおける細胞培養を行った結果(図8)、無処理ディッシュ、細胞培養用ディッシュ、細胞接着性ディッシュ、コラーゲンコートディッシュ、ポリリジンコートディッシュにおいては播種細胞数を超えないか、または増殖が効率的でないのに対し、SWNTでは顕著な増殖促進効果を示した。これは、カーボンナノチューブのタンパク質吸着力および適度な凹凸を持つナノ構造が基本的な能力として、延命効果を発現し、SWNTではさらに増殖促進効果を発現するためであると推測される。一方で、低血清培地における培養は、毒性を示す材料であれば顕著な毒性を示すのに対し、逆に今回の検討では毒性を示さず、SWNTでは顕著に、MWNTでは良好な増殖を示した。このことは、固体表面に固定したカーボンナノチューブは*in vitro*において細胞毒性を示さないことが推測される証拠の一つとなることを示している。さらに低血清培地における増殖率の向上は、Stem Cellの未分化培養、トランスフェクションの効率化、分化誘導の効率化、コストダウンなどに有利に働く可能性がある。

E. 結論

本研究においては、ナノ微粒子としてカーボンナノチューブを取り上げ、カーボンナノチューブ膜および細胞培養用ポリスチレンディッシュ表面にカーボンナノチューブ薄膜を作製し、骨芽細胞様細胞(SaOs2)を用いて細胞培養に対するカーボンナノチューブの影響を検討した。

その結果、SaOs2はカーボンナノチューブ膜上において一般的な培養条件にて良好な細胞接着および細胞増殖を示した。細胞接着では、細胞培養用ディッシュに対し単層カーボンナノチューブ(SWNTs, 0.9倍)、多層カーボンナノチューブ(MWNTs, 1.3倍)とい

れも強い細胞接着性を示した。また細胞増殖においても同様にSWNTs(1.2倍)、MWNTs(0.8倍)と良好な増殖を示した。特に毒性の影響が強く現れることが知られている低血清培地においてはSWNTs上にて顕著な増殖促進効果を示し、SWNTs(3.3倍)、MWNTs(1.0倍)と、カーボンナノチューブは細胞毒性を示さず、逆に有益な影響を細胞に与えることが分かった。

以上の結果より、カーボンナノチューブをろ過膜や培養基材表面へ固定した形態においては、骨芽細胞様細胞に対して細胞毒性を示さず、逆に細胞培養に対して良好な影響を与えることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Akasaka T, Watari F Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition. *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructure*, 16(2): 114-125, 2008.

2. 学会発表

1. 赤坂 司、阿部薫明、宇尾基弘、亘理文夫、“人工複合糖質高分子による *Streptococcus mutans* の増殖阻害機構”、第49回日本歯科理工学会学術講演会要旨集、P245 札幌、札幌コンベンションセンター 2007
2. 赤坂 司、阿部薫明、宇尾基弘、亘理文夫、“カーボンナノチューブのアパタイト修飾”、第17回無機リン化学討論会要旨集、P104 札幌、北海道大学 2007
3. Akasaka T, Abe S, Uo M, Watari F, “Inhibition of Growth of *Streptococcus mutans* by Artificial Glyco-Polymer.”, *Proceedings of the International Dental Materials Congress 2007*, P338 Thailand, The Imperial Queen's Park Hotel 2007
4. 赤坂 司、横山 敦郎、松岡 真琴、橋本 剛、佐藤 義倫、田路 和幸、阿部 薫明、宇尾 基弘、亘理 文夫、“単層カーボンナノチューブ膜での骨芽細胞様細胞の培養”、厚労省化学物質リスク研究事業「ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発」H18-化学一般-006第3回研究成果報告会 抄録集、P7 登別、第一滝本館 2007
5. 赤坂 司、横山 敦郎、土屋のりか、松岡真琴、阿部薫明、宇尾基弘、佐藤 義倫、田路 和幸、橋本 剛、亘理文夫、“単層カーボンナノチューブ膜上での骨芽細胞様細胞の細胞接着および細胞増殖”、第5回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会要旨集 P27 名古屋、ファインセラミックセンター 2007

6. 赤坂 司、横山敦郎、松岡真琴、阿部薫明、宇尾基弘、橋本 剛、
亘理文夫、“単層カーボンナノチューブ透明導電性薄膜での骨芽
細胞様細胞の培養”、第20回代用臓器・再生医療研究会総会要旨
集 P6 札幌、北海道大学 2008

7. 赤坂 司、横山 敦郎、土屋のりか、松岡 真琴、橋本 剛、佐
藤 義倫、田路 和幸、阿部 薫明、宇尾 基弘、亘理 文夫、“単層
カーボンナノチューブ透明導電性薄膜での骨芽細胞様細胞の培
養”、厚労省化学物質リスク研究事業「ナノ微粒子の体内動態可
視化法の開発」H18-化学一般-006 第4回研究成果報告会 抄録
集、P35 苫小牧、ホテル ニドム、2008

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

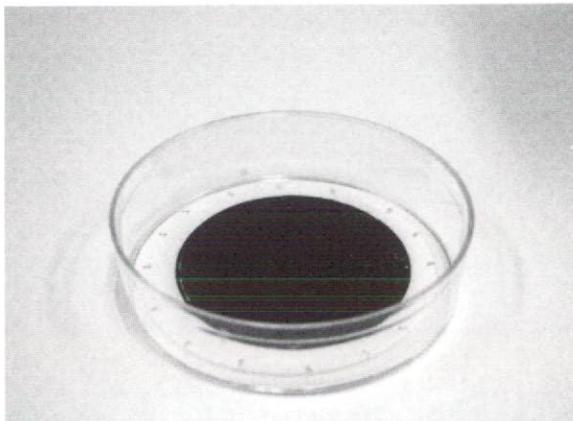


図 1-1

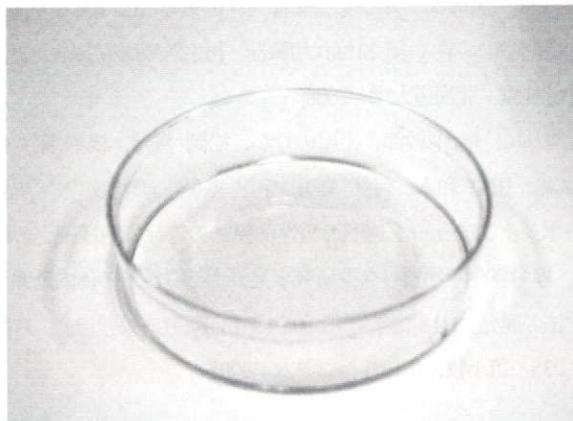


図 1-2

図 1 カarbonナノチューブ膜 (左) およびCarbonナノチューブ薄膜 (右)

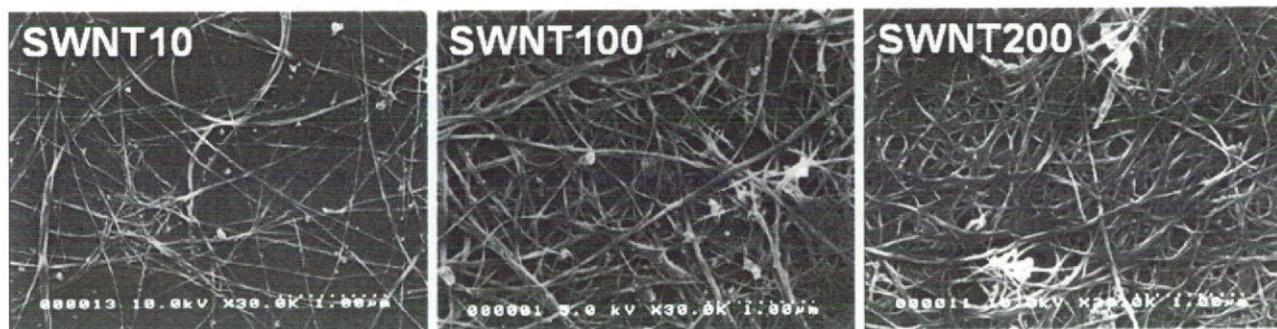


図 2 6cm ディッシュ単層Carbonナノチューブ (SWNT) 薄膜および膜のSEM像
(a) 10 μ g/dish, (b) 100 μ g/dish, (c) 200 μ g/dish

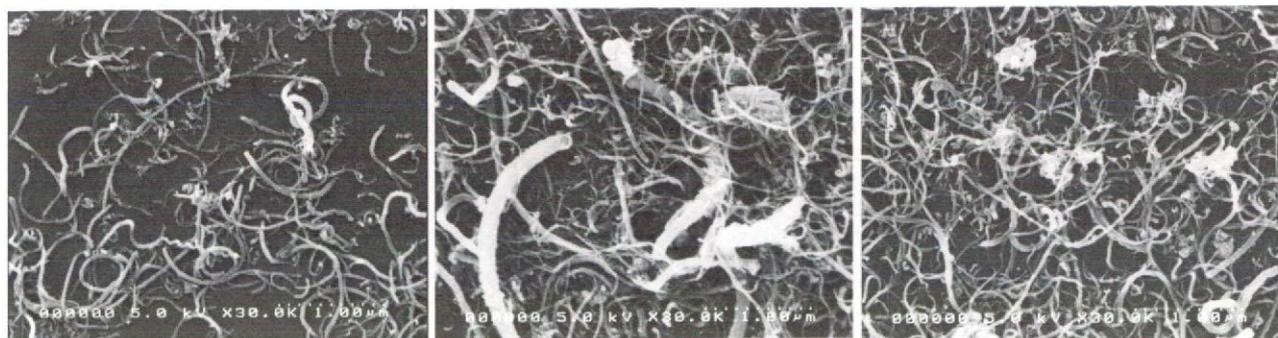


図 3 6cm ディッシュ多層Carbonナノチューブ (MWNT) 薄膜および膜のSEM像
(a) 10 μ g/dish, (b) 100 μ g/dish, (c) 200 μ g/dish

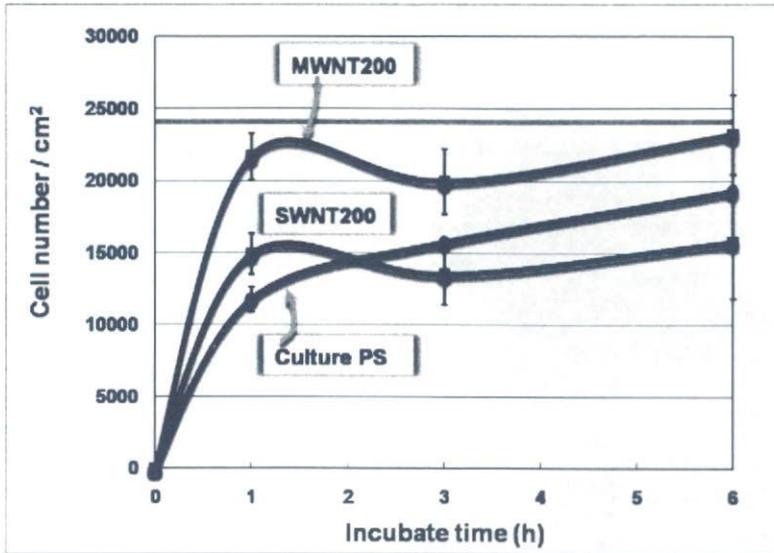


图 4

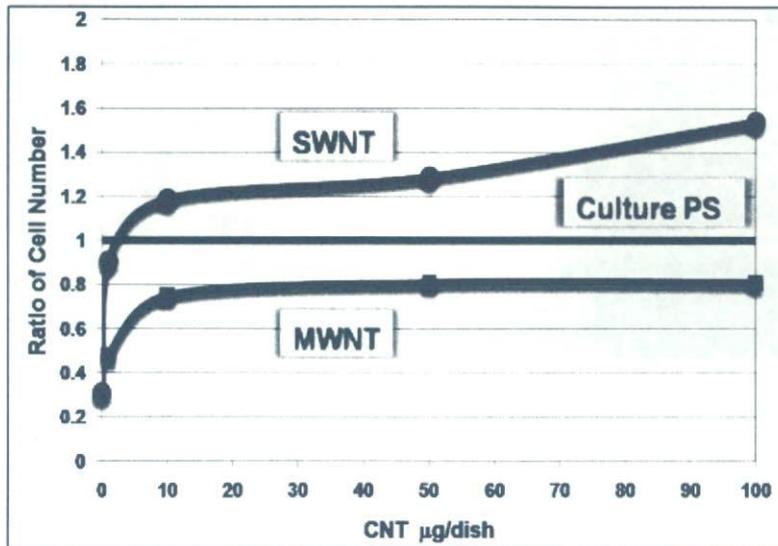


图 5

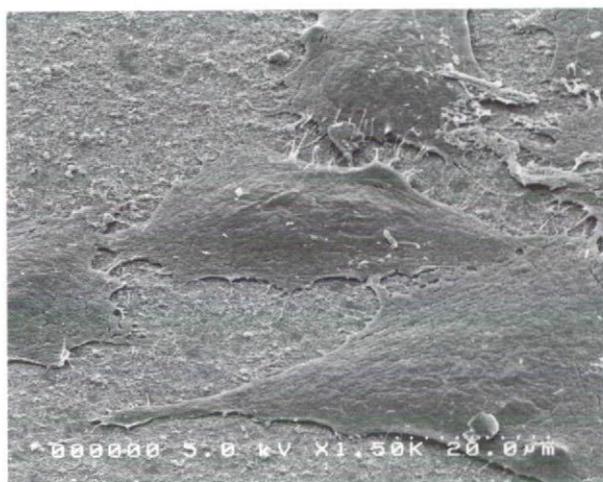


図 6-1

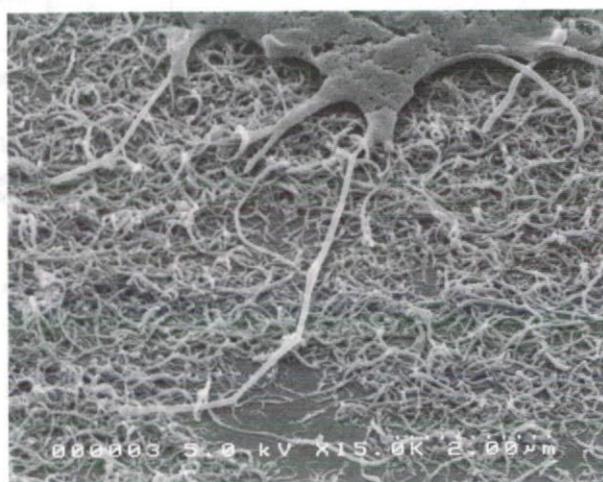


図 6-2

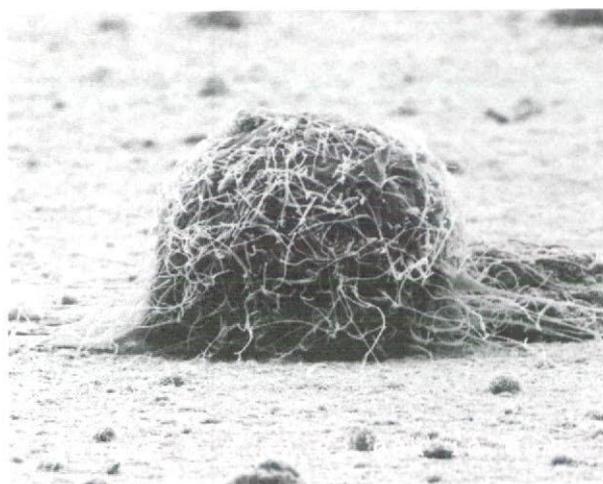


図 6-3



図 6-4

図 6 MWNT100 上での SaOs2 の SEM 像

(図 6-1) 伸展細胞の低倍率像、(図 6-2) 伸展細胞の強拡大像
(図 6-3) 円形細胞の低倍率像、(図 6-4) 円形細胞の強拡大像



図 7-1

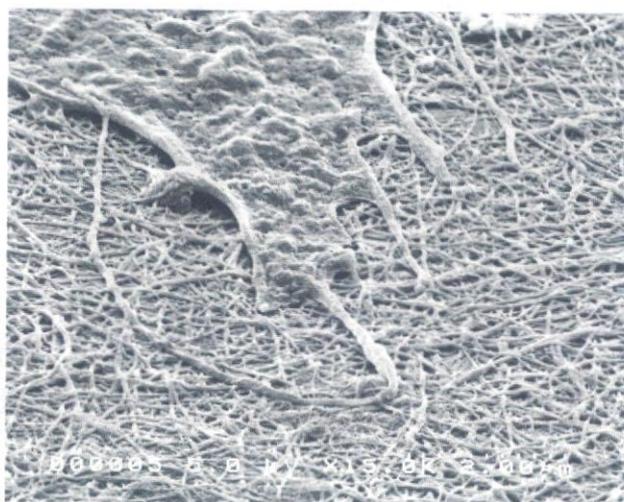


図 7-2



図 7-3

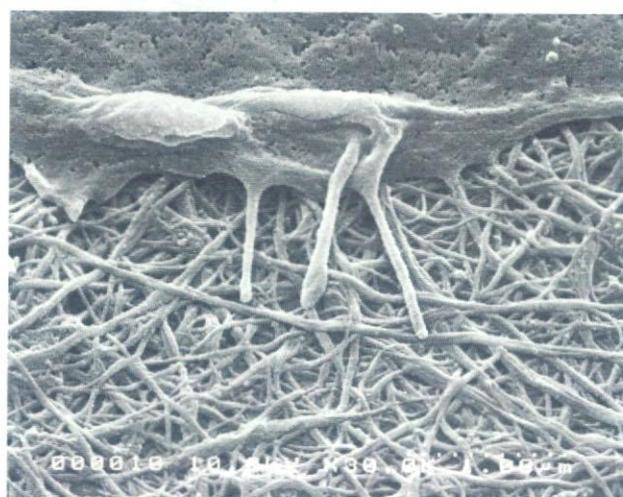


図 7-4

図 7 SWNT100 上での SaOs2 の SEM 像

(図 7-1) 密集細胞の低倍率像、(図 7-2) 細胞仮足の強拡大像
(図 7-3) 伸展細胞の低倍率像、(図 7-4) 細胞仮足の強拡大像