

14:30~14:40

「コラーゲン分子とカーボンナノチューブとの反応：コラーゲン線維形成に及ぼすCNTの影響」

北海道大学名誉教授¹ 北海道大学大学院歯学研究科²

○久保木芳徳¹・寺田典子²・北川善政²・亘理文夫²・宇尾基弘²

14:45~15:00 休憩

15:00~15:10

「カーボンナノチューブ強化アルミナ系複合材料に対するカーボンナノチューブの影響」

東北大学大学院工学研究科

○大森守、山本剛、橋田俊之

東北大学金属材料研究所

大久保昭、木村久道

15:15~15:25

「チタン合金の体内機能劣化と微粒子生成」

徳島大学大学院HBS研究部生体材料工学分野

○浅岡 憲三

15:30~15:40

「各種マイクロ・ナノ粒子の体内動態のイメージング（2）」

ー血中・経口・肺への直接投与の比較などー」

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体理工学教室

○阿部薫明、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座予防歯科学教室

江崎光恵、森田学

北海道大学名誉教授、(株)高研バイオサイエンス

久保木芳徳

15:45~15:55

「新規DNAキャリア分子を用いたアンチセンス核酸療法確立とその関節炎モデルマウスに対する効果」

北海道大学大学院医学研究科運動機能再建医学分野

○小野寺伸、遠山晴一、安田和則

北海道情報大学医療情報学科 小山芳一

株式会社ナパジェノミクス 宇野 篤、安藤弘法

北九州市立大学国際環境工学部 櫻井和朗

16:00~16:10

「イメージング質量分析を用いた生体組織観察（4）」

ブルカー・ダルトニクス株式会社

○葦澤 崇

東北大学 大学院 環境科学研究科

佐藤 義倫・久保 拓也・田路 和幸

北海道大学 大学院 歯学研究科

赤坂 司・横山 敦郎

16:15~16:25

「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」

○赤坂 司¹⁾、横山 敦郎¹⁾、土屋のりか¹⁾、松岡 真琴¹⁾、橋本 剛³⁾
佐藤 義倫²⁾、田路 和幸²⁾、阿部 薫明¹⁾、宇尾 基弘¹⁾、亘理 文夫¹⁾

1) 北海道大学 大学院歯学研究科

2) 東北大学 大学院環境科学研究科

3) 株式会社 名城ナノカーボン

16:30~16:45 休憩

16:45~16:55

「カーボンナノチューブ産業応用関連の最新話題

ー染色技術による CNT-nano-net の連続形成および極細繊維表面への *in-situ* 固定ー」

北海道大学大学院地球環境科学研究院

○古月文志

17:00~17:10

「歯科診療時に生じる切削粉の観察と MRI による体内動態可視化法の検討」

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座予防歯科学教室

○江崎光恵、森田学

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体理工学教室

阿部薫明、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫

17:15~17:25

「ゾウリムシの X 線顕微鏡による観察ーⅡ」

○矢田 慶治¹⁾、斉藤泰¹⁾、阿部大基²⁾、芳賀信幸²⁾

1) 株式会社東研、2) 石巻専修大・理工

17:30~17:40

「透過電子顕微鏡用環境セルの開発と含水性試料観察の試み」

北海道大学大学院工学研究科材料科学専攻機能材料科学研究室

○大貫惣明 奥寺公也 浜田弘一 須田孝徳 橋本直幸

17:45~17:55

「カーボンナノ物質の生体内での動態ーラット尾静脈より注入した水溶化フラーレンの生体内分布ー」

○横山敦郎^{*1}、佐藤義倫^{*2}、葦澤崇^{*3}、赤坂司^{*1}、高橋ともみ^{*1}、笠井孝夫^{*1}、
田路和幸^{*2}、亘理文夫^{*1}

北海道大学歯学研究科^{*1}、東北大学環境科学研究科^{*2}、ブルカーダルトニクス^{*3}

18:00~18:10

「カーボンナノチューブのリスクアセスメントについて」

北海道大学歯学研究科

○亘理文夫

18:15 終了

平成20年2月26日(火)

9:00~9:10

「人工関節周囲組織中の金属の状態分析と透過電子顕微鏡観察及びNi-Ti合金の腐食生成物の状態分析」

○宇尾 基弘、亘理 文夫(北大院 歯学研究科)

小野寺 伸(北大院 歯学研究科)

朝倉 清高(北大触媒科学研究センター)

浅岡 憲三(徳島大ヘルスバイオサイエンス)

橋本 直幸、奥寺 公也、浜田 弘一、大貫 惣明(北大院 工学研究科)

9:15~9:25

「植物細胞における多層カーボンナノチューブの毒性評価

(Toxicological evaluation of multi-walled carbon nanotubes in plant cells)」

北海道大学大学院地球環境科学研究院

○藤井明洋・古月文志

北海道大学大学院歯学研究科

亘理文夫

9:30~9:40

「カーボンナノチューブ上での神経細胞の培養」

北海道大学大学院歯学研究科

○松岡真琴・赤坂司・戸塚靖則・亘理文夫

株式会社名城ナノカーボン

橋本剛

9:45~9:55

「ナノハイドロキシアタパイトーコラーゲン複合体膜のBMP担体としての有効性」

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

○天雲太一、菅谷 勉、田中陽、福田寛恵、川浪雅光

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体理工学教室

宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫

10:00~10:10

「In vitro study of nano-apatite/collagen composite with chitin fibre reinforced PLLA matrix」

○Xiaoming Li^{1,2}, Qingling Feng², Fuzhai Cui² and Fumio Watari¹

¹ Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University;

² Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, China

10:15~10:25

「ポリポッド状二相性ナノ結晶子炭酸アパタイトの創製」

九州大学大学院歯学研究科

○石川邦夫・下御領良二・竹内あかり

10:30~10:45 休憩

10:45~10:55

「チタンと生体分子との相互作用のナノレベル解析法の開発」

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

○平田伊佐雄・岡崎正之

11:00~11:10

「金属ナノ構造体を用いるLDI質量分析」

(東大院理・関西大化学生命工) ○米澤徹・川崎英也・渡辺健宏・荒川隆一

11:15~11:25

「ナノテクによる幹細胞分化過程の制御—コンセプトの提案」

名古屋工大・工学研究科

○奥山 文雄

11:30~11:40

「骨芽細胞様細胞の成長に及ぼす Imogolite 及び CNTs スキャホールドの影響」

北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座小児・障害者歯科学教室

○石川紘佑、八若保孝

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体理工学教室

赤坂司、亘理文夫

産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 地下環境機能研究グループ

鈴木正哉

11:45~11:55

全体討論、今後の方針

北海道大学大学院歯学研究科

亘理 文夫

12:00 終了

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と金属への応用

○寺田典子, 宇尾基弘, 北川善政, 亘理文夫
北大院歯

Development of a multiwalled carbon nanotube coating on collagen
for cell culturing and application metals.

○Michiko TERADA, Motohiro UO, Yoshimasa KITAGAWA, Fumio WATARI
Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

[目的]

カーボンナノチューブは機械、化学、電気的特性に優れ、非常に興味深い物質として多方面で注目され、その応用が特に期待されている。最近では CNTs の生体親和性に関する報告もみられてきている¹⁾。

我々は、コラーゲンコートされたディッシュに MWCNTs を吸着させ、新たな細胞培養担体を開発した。そこで、その技術を金属へ応用し、インプラントと骨とが MWCNTs を介し、より強固な骨結合が認められるインプラントの表面性状の開発を本研究の目的とした。

[材料および方法]

精製した MWCNTs に水酸基を付与し²⁾界面活性剤水溶液に均一に分散後、コラーゲンディッシュに付着させ、MWCNTs コートディッシュを作製した。得られたディッシュ表面の MWCNTs 付着状態を観察し、ラット線維芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を播種後、細胞親和性などを評価した。

金属は生体親和性のあるチタンを用いた。チタン表面のシランカップリング処理後、コラーゲンを付着させ、ディッシュと同じ手法にて MWCNTs を付着させた。その試料を WKAH 系雄ラットの頭蓋骨上骨膜下に 4~7 週留置した。評価はピラヌエバ骨染色後、樹脂包埋した組織標本を光学顕微鏡での観察とした。

[結果]

MWCNTs は凝集体を殆ど作らず、コラーゲンに均一に付着した(図 1)。MWCNTs コートディッシュ上の E1 細胞活性の経時的変化に関し、対照のコラーゲンコートディッシュと比べてやや低い細胞活性を示した。細胞増殖率も同様であった。但し、対照のコラーゲンは極めて細胞親和性が高いものであり、MWCNTs コートによっても細胞への親和性はあまり低下していないと考えられる。

チタンへの応用では、ディッシュ同様に MWCNTs を均一に吸着させることができた。SEM にて、チタン上に collagen と MWNTs が付着しているのが認められた(図 2、MWCNT-coated Ti)。MWCNT-coated Ti を頭蓋骨上骨膜下に数週間留置し試料を光学顕微鏡にて観察したところ、対照の研磨 Ti、collagen-coated Ti、と同様に骨はあまり再生されな

かった（図3）。今後は試料を大腿骨骨髓内に埋入し、骨の再生と結合に関して研究を進めていく予定である。

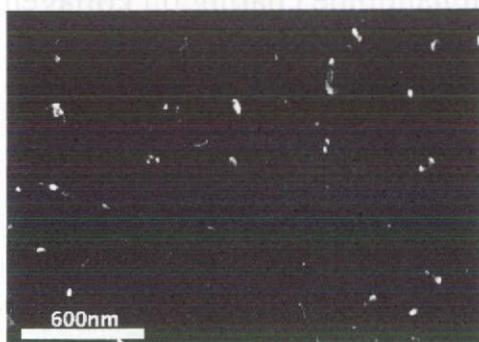


Fig.1 SEM image of MWCNTs coated collagen

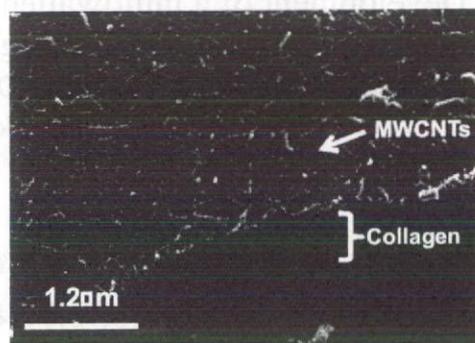


Fig.2 SEM image of MWCNT-coated Ti.

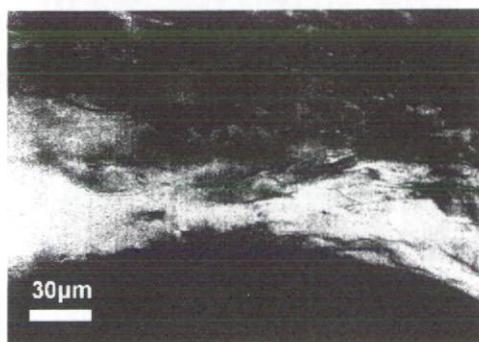


Fig.3 Optical microscope image of interface between MWCNT-coated Ti and bone.

- 1) N. Aoki, et al. Cell Culture on a Carbon Nanotube Scaffold. ASP 2005; 1(4): 402-405
- 2) H. Peng, et al. Sidewall Carboxylic Acid Functionalization of Single Walled Carbon Nanotubes. JACS 2003; 125(49): 15174-15182

元素分析走査プローブ顕微鏡-XANAM-の開発

北海道大学触媒化学研究センター

鈴木秀士・○朝倉清高

1. 序

走査プローブ顕微鏡 (SPM) は誕生して、25年がたった。この4半世紀の間に、半導体、触媒、センサー、バイオなど多岐にわたる分野に広く応用され、ナノレベルでの表面構造や形態観察に役立てられている。しかしながら、観測された物体の元素種などの化学状態に関して直接決定することが難しく、走査トンネル顕微鏡の長年の懸案になっている。私たちは放射光と走査探針顕微鏡の一つである非接触原子間力顕微鏡 (NC-AFM) とを組み合わせた元素分析SPM (XANAM: X線支援非接触原子間力顕微鏡法 (X-ray Aided Noncontact Atomic Force Microscopy)) を開発をした。

この手法はNC-AFMチップ先端と表面との間に形成され、原子間力を内殻電子の励起により制御するという方法であり、局所ポテンシャルに依存することから、高い空間分解能が期待される手法である。一方で、高い原子間力選別感度を要求する手法であり、S/Nの高い装置開発が必要とされる。

私たちはこれまでに図1に示すように、原子間力が吸収端前後で急激に変わるという現象を報告した¹⁾。さらに、その原子間力が表面との距離およびエネルギーによりどのように変化するかというフォースカーブのX線エネルギー依存スペクトルを取得した。また、解像度は高くないものの2次元画像の取得したので、報告する。

2. XANAM

NC-AFMはチップ先端と表面との原子間力を感じて表面からの距離情報を取得し、横方向にスキャンすることで、その凹凸を原子レベルで測定し、表面像を得る手法である。この原子間力は、一般にvan der Waals力であると言われている。一方、近年この原子間力が、van der Waals力のみならず、共有結合力も関係していることが指摘されるようになった。もし共有結合力が含まれるのであれば、内殻電子をこの結合に関与した軌道にたたき上げることができれば、原子間力を変化させることができる。内殻電子は、吸収端と呼ばれる元素固有のエネルギーをもつX線により励起することができるので、吸収端

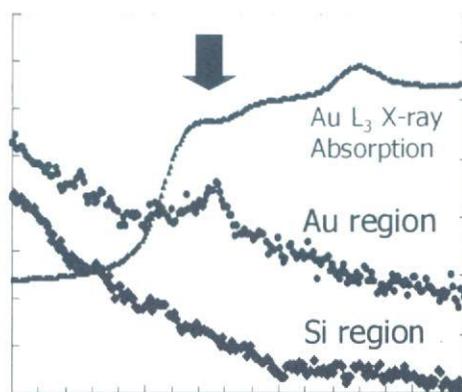


図1 XANAM スペクトル

付近のエネルギーを持つX線を入射させれば、その元素のみの原子間力を変化させることができ、化学マッピングが可能となる。そこで、Si基板の上にAu薄膜を蒸着し、Auの領域およびSiの領域にNC-AFM探針の針先を固定して、X線のエネルギーを掃引したところ、図1に示すようなスペクトルの取得に成功した。すなわち、Auの領域に針先を固定した場合にのみAu吸収端付近で、探針と表面との原子間力が変化し、NC-AFMのシグナルにピークが出現した。

3. フォースカーブの取得

さて、NC-AFM探針と表面との力場詳細を検討するために、X線のエネルギーをAu吸収端周辺のエネルギーに固定して、距離を変化させ、そのときに生じる原子間力の変化を追跡した。これはフォースカーブと呼ばれ、その結果を図2に示す。Au L_3 吸収端は11919 eV付近に変曲点をもつが、図2に示したフォースカーブは、このエネルギー付近で原子間力が大きく変化している事がわかる。すなわち、吸収端前においては原子間力が距離に伴い大きく変化し深いポテンシャル井戸の存在が示唆されるが、吸収端後はポテンシャル井戸がなくなるという顕著な現象が観測された。また吸収端付近で、ポテンシャル井戸が急激に深くなり、原子間力の変化が顕著であることを示している。

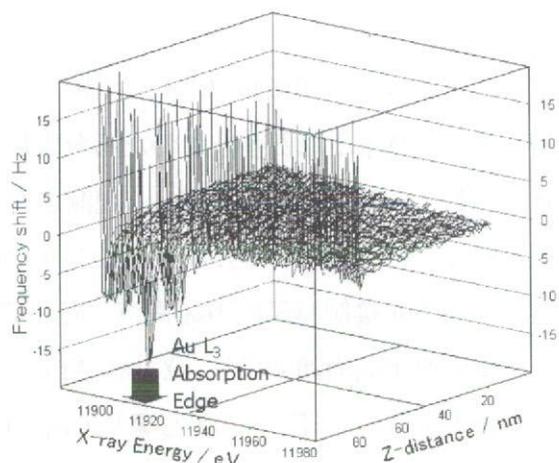


図2 Force curve のX線エネルギー依存性

4. XANAM像の取得

NC-AFM探針を掃引しながら、X線のエネルギーを吸収端前と力が変化するところとの2カ所のエネルギーで交互に測定したところ、図3に示す。前後のエネルギーを変化させるたびに大きく原子間力は変化して、エネルギー応じて筋が現れる。

今後は電子線リソグラフィ法によってAuアイランド/Si基板、Niアイランド/Si基板を作成し、実際に空間分解能を検討する予定である。

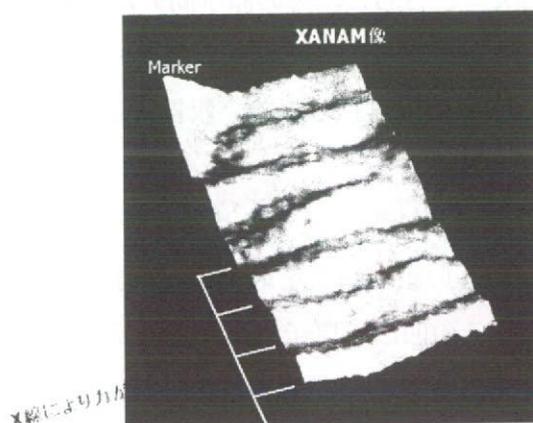


図3 XANAM 像

¹ S. Suzuki, Y. Koike, K. Fujikawa, W.-J. Chun, M. Nomura, and K. Asakura, *Chem. Lett.* **33**, 636 (2004).

細菌における多層カーボンナノチューブの毒性評価

北海道大学大学院地球環境科学院

○高廣 充・古月文志

北海道大学大学院歯学研究科

巨理文夫

1. 緒言

近年、ナノテクノロジーの著しい発展により、その産物であるナノマテリアルも増産の一途をたどっている。しかし、その一方でナノマテリアルの環境中への暴露に対する懸念といった問題も付随してきている。

代表的なナノマテリアルの一つであるカーボンナノチューブ (CNT) は、その特異な形状に由来する性質を利用して、エレクトロニクスやエネルギー分野において研究が進んでおり、近年ではバイオ分野への応用も進められている。しかし、そうした研究・開発が進められる中で、CNT自体の毒性に関する研究は、動物細胞、それもヒト細胞に集中しており、植物やその他生物への影響については未だ十分な知見を得られていない。微生物は、環境中に普遍的に存在し、CNTが環境中に暴露された場合、最も接する機会の多い存在であると言えるが、その影響を論じた報告もまだ十分なものではない。そこで、本研究では微生物、特にバクテリアに焦点を当て、CNTによる影響の評価を行った。

2. 実験方法

2.1 試料および菌株

実験には、Bayer製の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を使用した。また、MWCNTは未処理のものと、塩酸処理により含有金属を除去したものの2種類を用意した。

対象の微生物には、モデル微生物である大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α 株を用いた。

2.2 プレーティングによる生菌数の測定

2種類のMWCNTをLB液体培地中に1%添加し超音波処理による分散を行った。分散後の溶液を遠心分離し、上清と下層に分けた。これら溶液にコントロールを加えた、計5種類の溶液を用意し、オートクレーブによる滅菌を行った。滅菌後の各溶液に大腸菌を植菌し、37°Cで16時間振とう培養した。培養後の溶液を寒天培地にプレーティングし、コロニー数による生菌数を測定した。

3.2 SEMによる大腸菌の形態観察

2.2の培養液を、グルタルアルデヒドにより固定し、エタノールによる脱水、t-ブチルアルコール置換後、凍結乾燥処理を行った。処理後の各サンプルについて、SEMによる形態観察を行い、膜

損傷の有無を確認した。

3. 結果および考察

3.1 プレーティングによる生菌数の測定

振とう培養後の各培養液を、希釈し寒天培地にプレーティングした結果、処理後のMWCNTを添加した溶液で最もコロニー数が多く、未処理のMWCNTを添加した溶液がコロニー数も少ないことが確認された。このことから、未処理のMWCNTでは、含有金属による影響により生育が阻害されたことが示唆された。一方、処理後のMWCNTを添加した培地では、コントロールよりもコロニー数が増加しており、MWCNT自体は阻害よりも生育因子としての影響が強いことが示唆された。

3.2 SEMによる大腸菌の形態観察

SEMによる形態観察を行った結果、MWCNTを添加した場合でも、大腸菌はその多くが比較的きれいな状態のまま形態を維持しており、膜損傷等による形態の変化といったものは特に見受けられなかった。また、塩酸処理したものと未処理のものとも、暴露された大腸菌の形態に違いは見られなかった。

使用したMWCNTは直径が10-30nm程度であり、比較的柔軟な構造を有している。また、大腸菌はグラム陰性細菌であり、細胞膜の外側を外膜とペプチドグリカン層に覆われた構造を持っているため動物細胞に比べ外からの刺激には強い。これらのことから考えると、MWCNTでは構造的に細菌の細胞壁に突刺さりにくいと考えられる。

ただし、SEM観察のための前処理の段階で損傷した細胞が流出してしまったなどの可能性もあり、今後の検討が必要である。

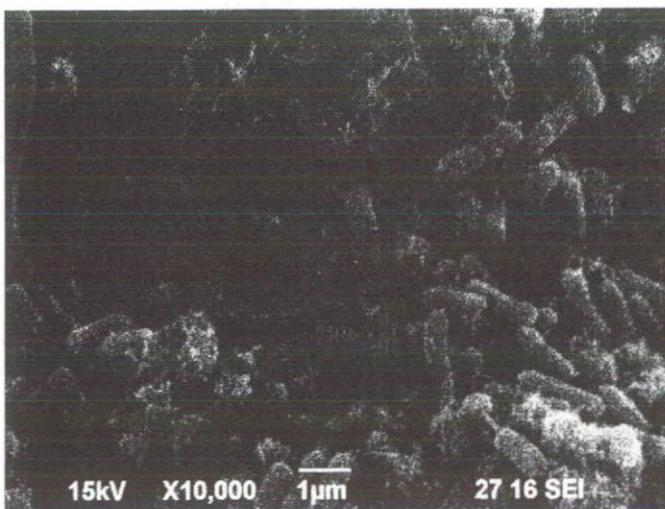


図1. 未処理のMWCNT中で培養した大腸菌

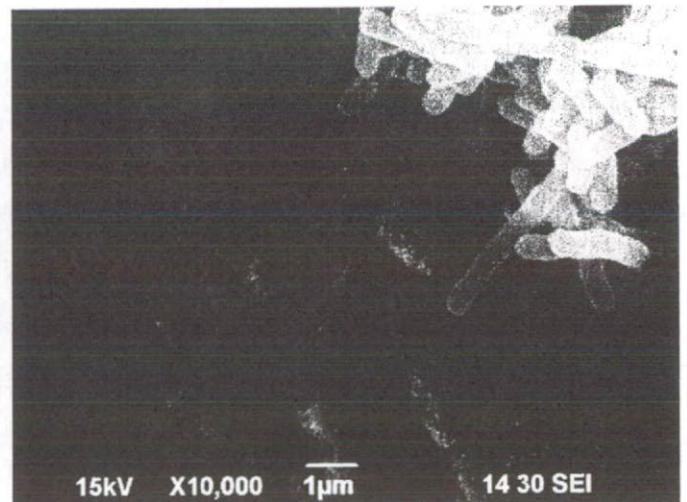


図2. 塩酸処理したMWCNT中で培養した大腸菌

ゾウリムシにおける銀ナノ粒子の細胞毒性試験Ⅱ

石巻専修大学・理工

阿部大基・羽田紘一・○芳賀信幸

1. 背景と目的

近年、Ag粒子の細胞毒性に関する報告が増加している。Human alveolar epithelial cells ではDNAの断片化を伴うアポトーシス (2007)、PC-12 (Cultured neuronal phenotype) ではドーパミン生産の減少 (2006)、Rat liver derived cell ではミトコンドリアの機能低下やLDHの漏出、細胞の縮小化、さらにGSHレベルの減少など (2005)、*Escherichia coli* に対する抗菌効果 (2005) *Pseudomonas aeruginosa*では生体濃縮が確認されている (2004)。特に、Murine alveolar macrophage cell, Human macrophage, Human epithelial lung cell を用いた系では、様々なレベルで細胞毒性が検証されている (2007)。

しかし、Ag粒子の細胞毒性に関するメカニズムについては、活性酸素等によるoxidative stressが議論されている程度で、致死因子を定量的に捉えて毒性発現のメカニズムを解析した報告はまだなされていない。我々は、3種類の異なる平均粒径を持つAg粒子を作製し、ゾウリムシをバイオアッセイ系としてAg粒子の細胞毒性を検討してきた。その結果、Ag粒子由来の致死因子の活性はAg粒子の粒径の減少に伴い増加し、平均孔径5オングストロームの透析膜を通過し、数週間に亘って水溶液中で安定に存在することが明らかになった。

本研究では、致死因子の同定と毒性緩和効果を持つ物質の検索、および細胞の標的部位の推定に関して、最新の知見を述べる。

2. 実験方法

Ag粒子は真空蒸着装置に希ガスを導入するためのガス導入機構とその圧力制御および圧力モニター機構を装着することによって、不活性ガス雰囲気下でAg金属塊を加熱蒸発し、形成された気相から固化させる「希ガス中蒸発法」によって作製した。用いたAg粒子は平均粒径が17、21、28 nmのもので、粒子径はX線回折のライン幅から算出した。

ゾウリムシはレタスジュース培養法によって培養した。Ag粒子の細胞毒性評価は10細胞を一組とした培養系で行った。

透析処理はAg粒子分散液を平均孔径5オングストロームの透析チューブを用い、蒸留脱イオン水に対して13℃および24℃で24時間行った。また、光触媒効果を検定する際には、遮光した容器を用いた。

透析外液中のスーパーオキシドアニオン (O_2^- など) の検定は、Superoxide Anion Assay Kit

(SIGMA)によってXanthine / Xanthine Oxidase系をpositive controlとして行った。

透析外液中のAgイオンの定量は東北緑化環境保全（株）に発注し、誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）によって行った。

3. 結果

3.1 Ag分散液中での遊泳行動および細胞形態の変化をFig. 1 に示した。ゾウリムシを分散液中に入れると、まず繊毛運動が逆転する逃避反応が見られた（回転・方向転換）。この反応はAg粒子の粒径が大きくなるにつれて長くなり、結果的に細胞死への時間も延長した。一方逃避反応に続く形態的变化はすべてのサイズの粒子において共通のパターンを示しながら同じような経過時間の後に細胞死を迎えた（変形・後退遊泳・死亡）。逃避反応は、Ag粒子由来の致死因子が細胞膜の外側から作用し、膜電位の脱分極を誘発し、その結果生じた膜電位依存性カルシウムチャネルの活性化を介して細胞内カルシウムイオンの上昇によるものであると考えられる。その後の長時間に及ぶ繊毛運動の逆転反応は細胞内カルシウムイオンの濃度が高いレベルで維持された状態を反映しているものと考えられる。従って、カルシウムイオンのポンピングアウト機構においても異常が生じている可能性がある。

3.2 Ag分散液中で死亡した細胞の形態変化をFig. 2 に示した。コントロール細胞に対して、Ag粒子分散液中で死亡した細胞は長軸が短縮し、細胞尾部には著しい縮小化が見られる。このような形態変化はどの粒子においても、また、透析外液中で死亡した細胞においても共通に見られた。

3.3 Ag粒子平均粒径17 nmの生存曲線をFig. 3 に示した。各実験群のすべての細胞が死亡するまでの時間は分散度に依存して短くなった。次に、致死作用に対するサイズ効果を見るため分散度を10 μ g/mlに調製した3種類の粒子で比較した（Fig. 4）。60分間の暴露実験では致死作用は粒子サイズに依存することが明らかになった。しかし、24時間の長期間暴露実験では、どのサイズの分散液においても生存した細胞は無かった。

3.4 Ag粒子分散液を透析した時の透析外液中での生存曲線をFig. 5 に示した。透析は24時間ごとに透析外液を交換しながら13日間連続で行った。グラフには最初の24時間処理（1日目）、7日後（7日目）および13日後（13日目）とコントロールとしてAg粒子分散液（17 nm, 50 μ g/ml）を示した。すべての実験群で5分以内に細胞死が確認された。従って、致死因子は透析膜を通過する性質があり、Ag粒子から継続的に生成されていることが明らかになった。

3.5 子牛血清アルブミン（BSA）のAg粒子致死因子に対する毒性緩和効果をFig. 6 に示した。平均粒径17 nmのAg粒子分散液（50 μ g/ml）に種々の濃度のBSAを加えた溶液を調製し、それぞれの溶液の中

での生存率を調べた。その結果、100分間の暴露実験では、BSA濃度が上昇するにつれて生存率が上がり、300 $\mu\text{g/ml}$ では細胞死は認められなかった。また、透析外液の致死因子に対しても同様の毒性緩和効果があった。

一方、24時間の長期暴露実験では、BSAの毒性緩和効果は透析外液に対しては有効であったが、Ag粒子分散液では、BSAの毒性緩和効果は失われた。この結果は、Ag粒子からは致死因子が継続的に生成されているという透析実験の結果を支持しており、BSAは致死因子に対してキレート作用によって毒性を緩和していることを示唆している。

3.6 Superoxide Anion Assay Kit (SIGMA) によって透析外液中のSuperoxide Anion (O_2^- など) 量を測定した結果、24時間の透析処理による透析外液中からはSuperoxide Anionに由来するシグナルは検出されなかった。

3.7 誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) によって透析外液中のAgイオン量を測定した結果、数十 $\mu\text{g/L}$ のレベルでAgイオンが検出された。測定を行った担当分析者からは、このレベルのAgイオンは操作上のアーテファクトでは考えられないほどの高いレベルであるため、Ag粒子から生成した可能性が極めて高いというコメントがあった。しかし、この分析結果に関しては、現在、コントロール試料のパターンを増やすなど、再現性を確認する実験を行っている。

まとめ

1. Ag粒子分散液はゾウリムシに対して強い細胞毒性を示した。
2. 致死作用は粒子の分散度に依存して上昇した。
3. 致死作用は粒子のサイズが小さくなるにつれて上昇した。
4. 致死因子は平均孔径5オングストロームの透析膜を通過した。
5. 致死因子はAg粒子から継続的に生成していると考えられる。
6. 致死効果のある透析外液からSuperoxide Anionは検出されなかったが、Agイオンが検出された。
7. 致死因子は細胞膜の膜電位に影響を与え、膜電位依存性カルシウムチャネルの活性化とカルシウムポンプの不活化機構に異常を引き起こす可能性が示唆された。
8. これらの知見は検索した限り、どの生物種においても報告されていない。

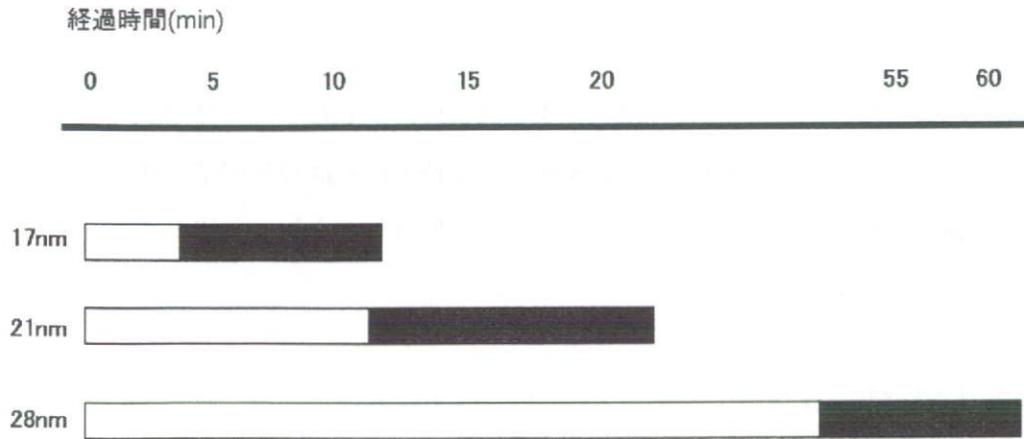


Fig. 1 Ag分散液中での遊泳行動および細胞形態の変化

各粒径のAg分散液中でのゾウリムシが死亡するまでの行動と形態の変化を模式的に示した図である。横軸は経過時間(分)を示す。

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。

短縮・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)。

逆転 : 繊毛運動の逆転による尾部を先頭にした遊泳行動。

死亡 : 繊毛運動や収縮胞などの細胞活動の停止を伴う細胞死。

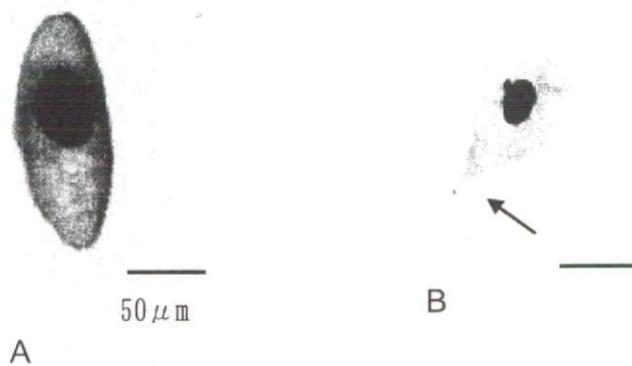


Fig. 2 Ag分散液中で死亡した細胞の形態変化

A: 無処理の細胞をカルノア固定し、1N塩酸で加水分解した後酢酸オルセインで染色した時の写真。
 B: Ag粒子(粒径17nm)分散液中で死亡した細胞をAと同様の方法で染色した時の写真。矢印は変形が著しい尾部を示す。

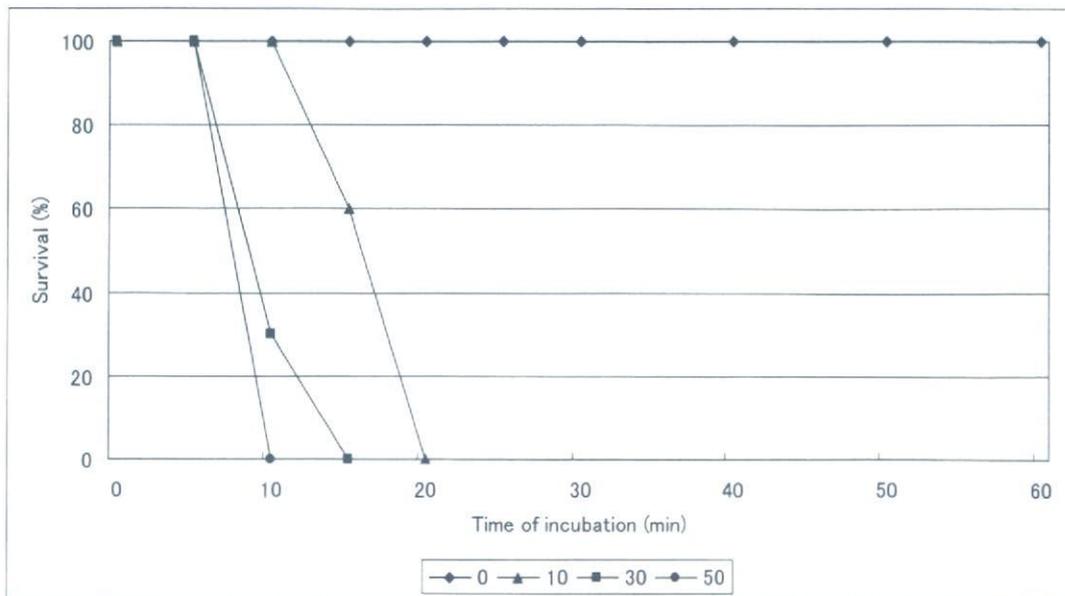


Fig. 3 (左図) Ag粒子(粒径17nm)分散液中におけるゾウリムシの生存曲線

縦軸は各10細胞ずつの細胞懸濁液でスタートし、5分ごとの生存率を示す。横軸は経過時間(分)を示す。

凡例に示した数値はAg粒子(粒径17nm)の分散度(μg/ml)である。

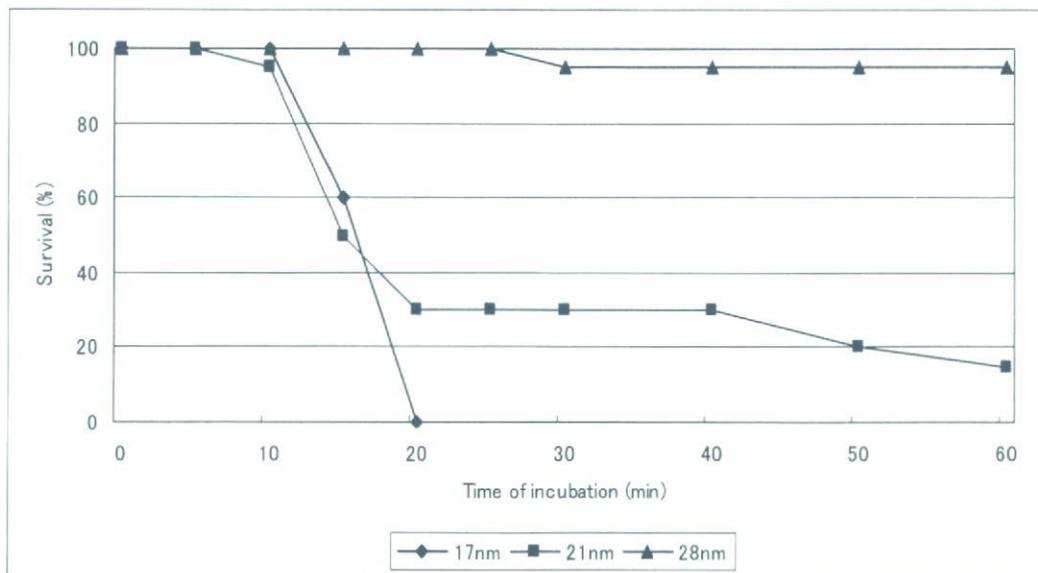


Fig. 4 (右図) サイズの異なるAg粒子分散液中での生存曲線

Figure1-3の10 μg/ml分散液における生存細胞を基に作成した。縦軸は生存率(n=10)、横軸は経過時間(分)を示す。凡例の数値はAg粒子の平均粒径を示す。

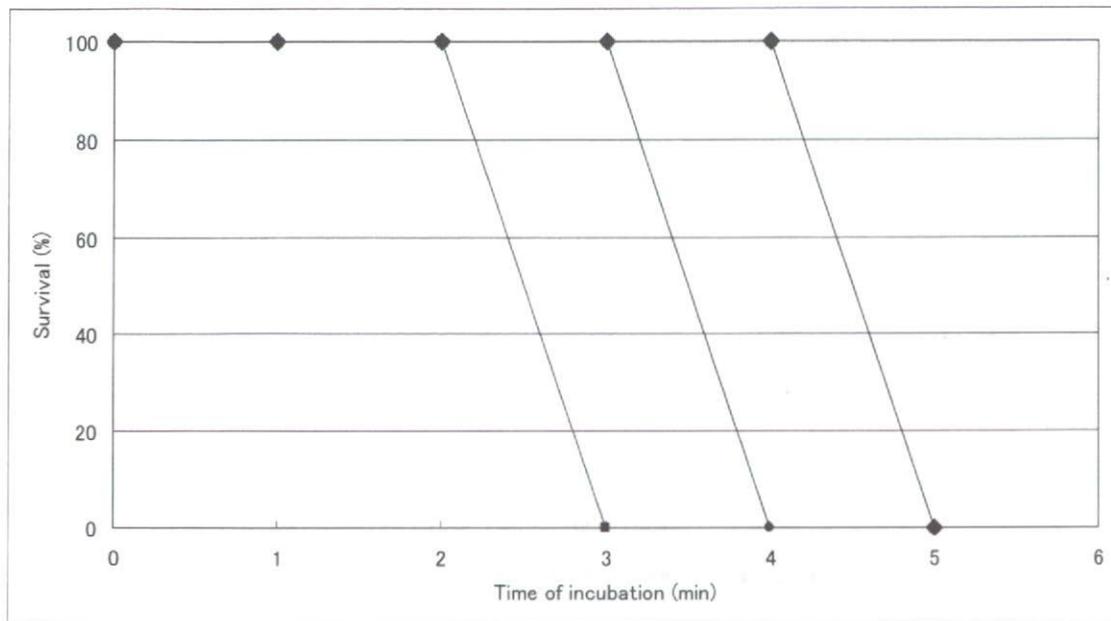


Fig. 5 Ag粒子分散液を透析した時の外液中での生存曲線

実験はFigure1 と同様の方法で行った。縦軸は1分ごとの生存率 (n=10) を示す。横軸は経過時間 (分) を示す。◆はAg粒子 (17nm) 50 μ g/ml、■は透析処理を1日行った透析外液、▲は透析処理を7日行った透析外液、●は透析処理を13日行った透析外液を示す。

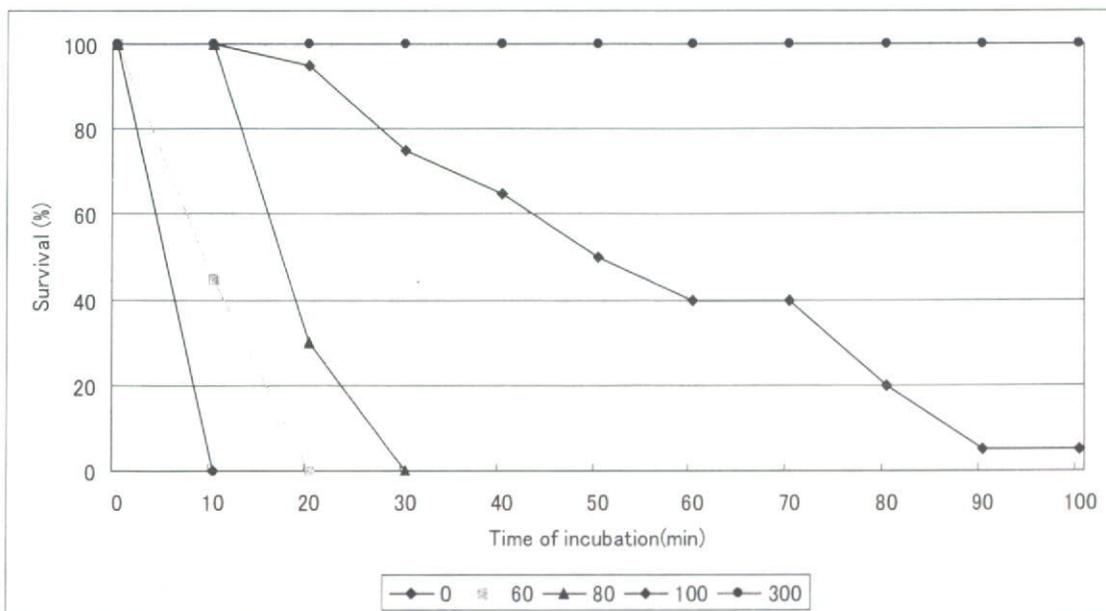


Fig. 6 BSAのAg粒子分散液に対する毒性緩和効果

縦軸はAg粒子 (粒径17nm, 50 μ g/ml) に種々の濃度のBSAを加えた溶液中での生存率 (n=10) を示す。横軸は経過時間 (分) を示す。凡例の数値はBSA濃度 (μ g/ml) を表す。

正常および癌肝細胞培養におけるCNT添加の影響

北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座

伊藤佐智子、八若保孝

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座

赤坂司、○亘理文夫

1. 目的

CNTは細胞に対して様々な興味深い影響を与えることを見出しているが、本研究では正常細胞と癌細胞へ及ぼす影響の違いを調べるため、ヒト正常肝細胞由来のHC細胞とヒト癌肝細胞由来のHepG2細胞の2種類の細胞株を用いCNTがそれぞれの細胞に及ぼす影響について観察、比較を行った。また、CNTの影響が複数の細胞の中から選択特異的に働くかどうかを検証するために、正常細胞と癌細胞の両者を共培養する実験も行った。

2. 実験方法

1) MWCNTの添加による細胞への影響

CNTはあらかじめオートクレーブにて滅菌を行った

使用細胞株 : ヒト正常肝細胞由来のHC細胞およびヒト癌肝細胞由来のHepG2細胞

使用培地 : HC細胞には専用のCS-C培地 (Cell systems 社)、HepG2細胞にはDMEM培地を用いた

培養環境 : 37°C、5%CO₂環境下にて10日間培養後、CNTを添加し、さらに7日間培養した後位相差顕微鏡にて細胞を観察した

2) 正常細胞と癌細胞の共培養

HC細胞用のCS-C培地とHepG2細胞用のDMEM培地のそれぞれにHC細胞とHepG2細胞を播種し、ディッシュ底面にて80%コンフルエントを超える状態まで20日間培養を行った

3. 結果

Fig.1は培養10日後の位相差顕微鏡写真である。正常肝細胞ではディッシュ底面全体に一面に広がるように増殖し、コンフルエントに達するのに対して癌肝細胞では細胞が局所に積層状に凝集しコロニーを形成していた。

Fig.2はFig.1での培養後、CNTを添加しさらに培養7日後の位相差顕微鏡写真である。添加されたCNTは、正常細胞への接着は添加直後にみられたのに対し、癌細胞への接着は培養期間中ほとんどみられなかった。正常細胞ではCNT添加後もCNT無添加群とほぼ同等の形状をしていたのに対し、

癌細胞ではCNT添加後の細胞数がCNT無添加群より著しく減少していた。

また、正常細胞と癌細胞の共培養ではいずれの培地においても細胞増殖がみられ、数種の形状をもつ細胞が認められた。形成されたコロニーの周辺部には癌細胞様の細胞が、中心部には正常細胞様の細胞が多く観察された。

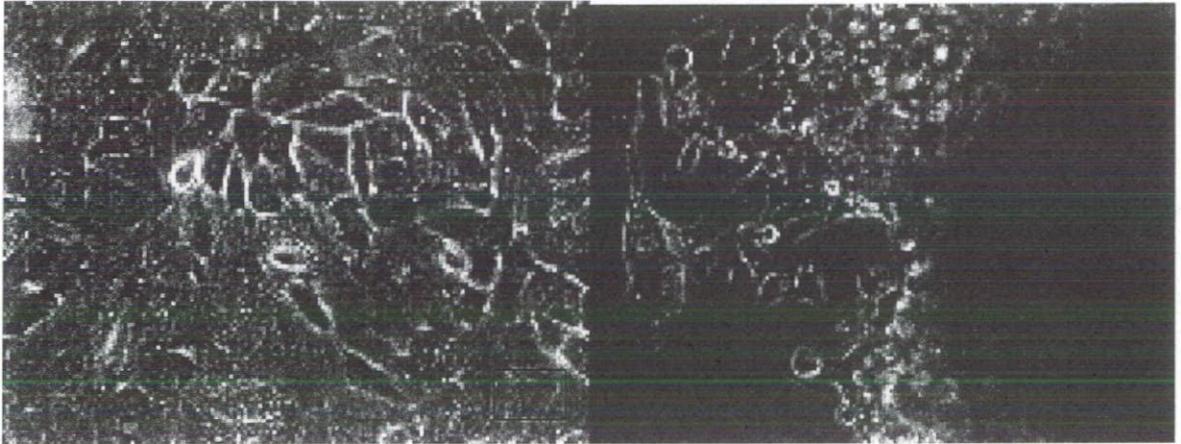


Fig.1 :培養10日後の位相差顕微鏡像。a:正常細胞、b:癌細胞像である。癌細胞では培養細胞が積層し、厚さが増大している。(右方部)

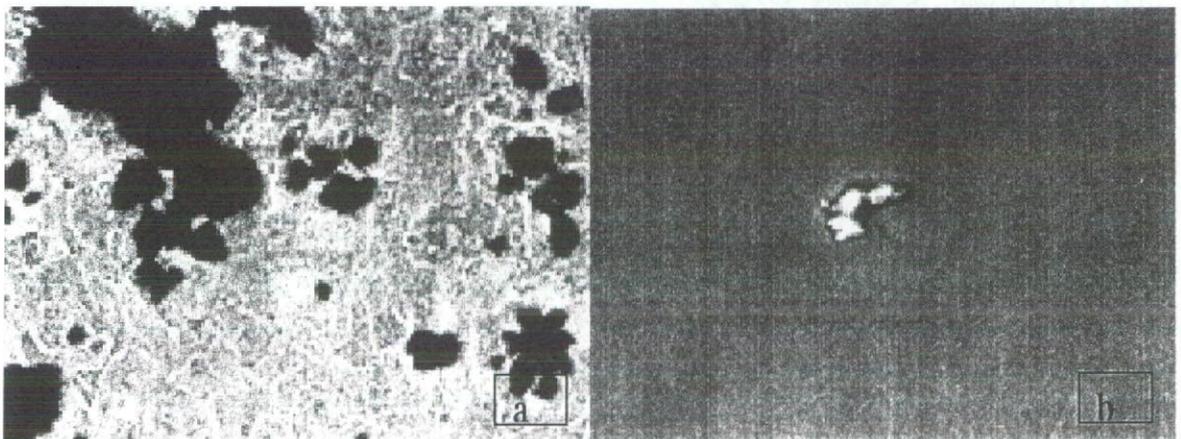


Fig.2 : Fig.1にて10日間培養後にCNTを添加した後、さらに培養7日後の位相差顕微鏡像。
a:正常細胞 b:癌細胞

4. 結言

今回の結果より、①正常細胞と癌細胞ではそれぞれ単独培養中の増殖パターンが大きく異なること、②CNTの細胞に及ぼす影響も細胞の種類によって大きく異なることが示唆された。細胞によって反応が異なるのであれば、生体内においてある標的細胞のみへ影響を特異的にコントロールできる可能性が今後考えられる。

コラーゲン分子とカーボンナノチューブとの反応： コラーゲン線維形成に及ぼすCNTの影響

北海道大学名誉教授¹ 北海道大学大学院歯学研究科²

○久保木芳徳¹・寺田典子²・北川善政²・亘理文夫²・宇尾基弘²

1. 緒言

カーボンナノチューブ(以下CNT)は新素材として、生体成分との反応性が注目されているが、生体の最大量タンパクであるコラーゲンとの反応は、あまり分かっていない。我々は、CNTが不溶性コラーゲンに吸着、これを黒色に染めることからかなり強い親和性を持つことを推定した。そこで今回は、凝集計を用いてCNTとコラーゲンとの反応を追跡することにした。すなわち、CNT懸濁液の濁度に対するコラーゲン添加の影響を調べたところ、微量の未変性コラーゲンの添加によって、CNTの凝集反応が顕著に進行するが、変性コラーゲンでは、凝集はまったく起こらないことを見出したので報告した。今回はさらに、CNTの存在がコラーゲン分子の繊維形成に影響を与える可能性を追求する。

2. 実験方法

CNTの懸濁液は、ナノカーボンテクノロジー社製の精製MWNTを、0.1%トライトン(Sigma)中に懸濁し30分間超音波処理し、10 ppm あるいは100 ppm になるように調製した。

染色には、100 ppm のCNT懸濁液の中に、ウシ皮膚不溶性コラーゲン、未変性紡糸コラーゲン(高研、インテگران)をはじめ、各種の不溶性コラーゲンを浸漬後、水洗・乾燥し光学顕微鏡で観察した。コラーゲン溶液は、市販のペプシン処理コラーゲン溶液(高研アテロセルI-PC)を用いた。

CNT懸濁液にコラーゲン溶液を添加するとCNTが凝集を起こすことがわかったので、その凝集過程を血小板凝集計(Scienco, Aggregation meter)を用いて、660 nmでの透過率(T%)の上昇によって測定した。

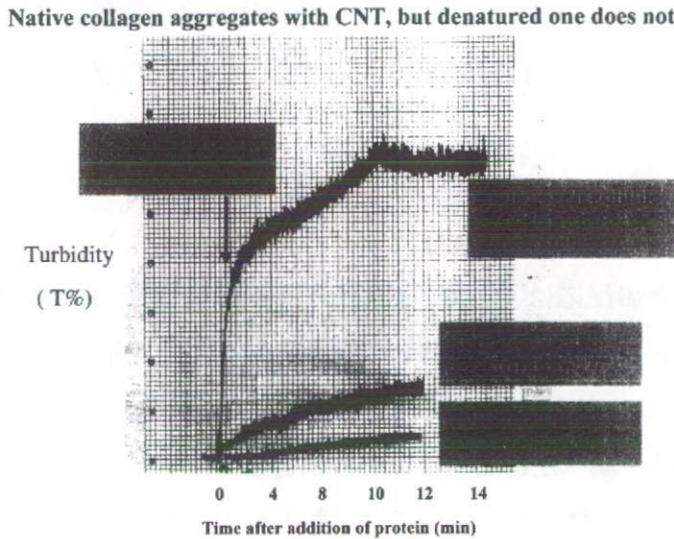
3. 結果

凝集計のセル内において、10 ppm のCNT懸濁液(0.1%トライトン)に終濃度25 ppm になるようにコラーゲン溶液を加えると急に濁度が減少しはじめ、15~20分に、平衡に達した。ところが、コラーゲン溶液を予め、60度にて数分間加熱変性すると濁度の減少は鈍くなり、加熱時間の増加と共にその傾向は強まり、1時間の加熱では全く濁度減少がなくなり、凝集は起こらなくなった。同濃度のアルブミン、ならびリゾチームでは、凝集は起こらないことがわかった。(図1)

この凝集現象は、24ウエルの培養シャーレ内でも、顕著に観察することが出来る。この場合は、

繊維状の沈殿が観察され、光学顕微鏡において繊維状の軌跡に沿ってCNTの沈殿像が見られる。この観察から、背後にはコラーゲン分子自身の凝集（線維形成）があると予想される。

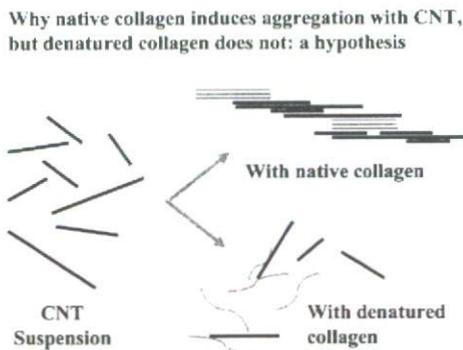
図1. 未変性・変性コラーゲンとCNTの凝集反応



2. 考察

以上の結果から、CNTと反応して凝集を起こすためには、コラーゲンの3次元構造、すなわちトリプルヘリクスが必要であり、棒状分子であればCNTが多数吸着し凝集を起こすが、ゼラチンになって、一定の立体構造を失った場合には、CNTは凝集できないと推定される。（図2）

図2. 未変性・変性コラーゲン分子とCNTの反応



この現象の説明には、コラーゲンによる血小板の凝集現象が手がかりになる。血小板の凝集においては、数分子の架橋結合したコラーゲンのオリゴマーの存在が必須である。CNTとコラーゲンの反応の場合には、コラーゲンの立体構造が、CNTの吸着と凝集の場を提供していると推定される。今後、コラーゲンとCNTとの反応メカニズムを解明するために、今回見出された凝集反応は重要な手がかりになると考えられる。