

# 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

東北大学金研：大久保昭、木村久道

## 1. 緒言

繊維状炭素については、その製造方法から前駆体法と気相法の二つに分けることができる。カーボンナノチューブのような気相法炭素繊維については、1960年代よりその発見が報告されてきた。そして、1993年に飯島らとBethuneらによる単相カーボンナノチューブ発見の報告がされ、広く研究者の関心を引くこととなった。単相カーボンナノチューブは構造が単純で、比較的欠陥が少なく、理論的な取り扱いが可能で、カーボンナノチューブの基礎的な研究を進展させることに大きく寄与した。カーボンナノチューブへの関心は基礎的な研究のみならず、そこから実用的な製品が生まれる可能性が大きいと、多くの企業も参加して製品の開発競争が行われている。これまでにLi電池の負極剤と鉛電池への混入による長寿命製品が開発・販売されている。これに続くのがカーボンナノチューブを含む複合材料と期待されてきた。この複合材料は従来技術で製造が可能で、特に高分子複合材料は製造が容易であるため、すぐに多くの製品の開発と販売されることが予想された。しかし、カーボンナノチューブの効率的な分散が困難であり、その利用はまだ限られたものにとしかかかっていない。

本研究では、実用的な製品の開発を目指し、未だ製品となっていないカーボンナノチューブ-アルミナ複合材料について合成条件の検討を行っている。この複合材料の生体への応用としては、人工股関節の長寿命ライナー、および人工歯根としての利用に期待が寄せられている。これまではアメリカのNanoLab社の多層カーボンナノチューブ(MWNT)を使用し、水酸化アルミニウムをアルミナの原料として複合材料を合成してきた。現時点では、これ以外にも種々のMWNTの購入が可能である。信州大学の遠藤らの技術によって開発されたMWNT(ナノカーボンテクノロジーズ社)は、繊維系が100nmに達するような太さであり、さらに2500°C以上の高温で処理されているため、結晶性がよくて凝集性が低く、金属系の不純物を含まないという特徴を有している。ここでは、この二つのカーボンナノチューブを使って複合材料を合成し、比較検討を行うことで、実用可能な材料開発を促進することを目的にしている。

## 2. 実験方法

複合材料の合成用のMWNTにはアメリカのNanoLab社(直径20-40nm)、および日本のナノカーボンテクノロジーズ社(直径40-90nm)の製品を用いた。アルミナの前駆体として水酸化アルミニウム( $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、和光純薬製)、添加剤として水酸化マグネシウム( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 、和光純薬製)とシリカゲル

( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬製)を使用した。これらの原料を蒸留水に分散し、界面活性剤を添加してスラリー状にして混合した。このスラリーを乾燥して得られた混合粉体を、アルゴンガス雰囲気において室温から600°Cまで1時間で昇温し、その温度に15分間保持して水酸化アルミニウムを分解して水分を除去した。この分解原料を使い放電プラズマ焼結機 (SPSシンテックス社製、SPS1050) により真空中で1500°Cの温度で15分間焼結し、直径30mmの円盤状の複合材料を得た。

複合材料の破断面を走査型顕微鏡 (SEM、日立製作所製、FE-SEMS-4700) により観察した。複合材料を $2 \times 3 \times 25 \text{mm}^3$ に切断し研磨してから、スパン20mmで万能試験機 (インストロン製、5582) により3点曲げ強度を測定した。同じ大きさの試験片と万能試験機を用いてノッチドビーム法により破壊靭性値を得た。

### 3. 結果および考察

2種類のMWNTについてその形状を透過電子顕微鏡写真で比較した。図1に示されるようにNanoLab社のMWNTの繊維は直径の殆どが50nm以下であるが、解膠されにくい塊が観察される。この繊維の特徴は中空の部分の径が大きく、表面に多くの欠陥があり、湾曲した形になっていることであり、200nmに達する太く曲がりくねった繊維も存在している。図2に示すナノカーボンテクノロジー社のMWNTのTEM写真では、直径が100nm以下と200nmの太い繊維が観察される。この繊維の特徴は中空の部分が細く、まっすぐに伸びた形で、結晶がよく発達して表面に欠陥が少ないことである。X線回折の結果はNanoLab社のMWNTは結晶性の悪いブロードな回折ピークしか見られないが、ナノカーボンテクノロジー社のMWNTでは、黒鉛の(002)による回折線に相当する位置にシャープなピークが存在し、結晶性がよいことが分かる。これらの結果は両方のMWNTの間にはかなりの違いのあることを示している。この二つのMWNTを使い複合材料を合成し、比較検討している。NanoLab社製のMWNTを使うと、混合を工夫しても塊となっている部分を除くことが出来ず、焼結後でもそれが残る。ナノカーボンテクノロジー社のMWNTには塊はなく、分散性に優れているようである。これはかさ密度に反映され、ナノカーボンテクノロジー社のMWNTを使った複合材料で大きくなっている。このような分散性の違いは、図1に見られるNanoLab社のMWNTの塊が、そのままアルミナ中に分散されるためである。図2に示されるナノカーボンテクノロジー社のMWNTでは、繊維径が太く曲がりにくいいため塊がなく、塊が残ることはない。この違いは複合材料の性能に反映されると考えられる。



図1 NanoLab社製のMWNT



図2 ナノカーボンテクノロジー社製のMWNT

図2に示されるナノカーボンテクノロジー社のMWNTでは、繊維径が太く曲がりにくいいため塊がなく、塊が残ることはない。この違いは複合材料の性能に反映されると考えられる。

# 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

○ 浅岡 憲三

## 1. はじめに

チタンおよびチタン合金は、骨代替材料、歯科インプラント材料、歯冠修復材料として利用されているのみならず、胆道、消化管、気道、尿路、血管の狭窄病変に対する治療、修復のためのステント、カテーテル、バルブ、アクチュエータ、クラッチ、ガスケットなどや心臓ペースメーカーのケースとしても利用されている。こうした機器の金属系部材はセラミックスやポリマーでは代替できない機能をもっている。しかし、寸法が極めて小さく、細く、そして体内の厳しい多様な環境下で利用されることが多いため、特異な機能、耐食性、強度、寿命、生物学的安全性に対する信頼性の確保が問題になっている。

本プロジェクトでは、チタン系医用合金の水素脆性による材料機能の低下、遅れ破壊及び付随して生じる微粒子について研究を進めた。水素は合金中に容易に侵入し、金属組織を変化させる特殊な元素であり、水素がチタン系機能合金の機能低下、合金強度、寿命の低下、腐食とマイクロ・ナノ粒子の生成促進に重要な役割を果たしている。また、チタン合金の機能低下速度は、各器官内の化学的環境、応力あるいはひずみの状態との関係で決まる。チタン合金の水素吸蔵の過程で発生する腐食生成物であるマイクロ・ナノ粒子が移植デバイス周囲の生体組織の悪性腫瘍、粘膜疾患の発症に関与する可能性が示唆されている。ここでは、Ni-Ti合金の生体組織接触部位、腫瘍近傍での腐食挙動を明らかにする目的で、生理食塩水と過酸化水素の混合溶液中での機械的、化学的、そして材料の組織変化について調べた<sup>1)</sup>。

## 2. 実験方法

直径 0.5 mm の Ni-Ti 超弾性合金を試料とし、0.15M NaCl と 0.3M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の混合液 (pH 5.5 - 6.0) 50 ml 中に浸漬した。合金の寿命は、溶液に浸漬した試料に一定定過重を負荷し、破断までの時間を測定して評価した。また、試料の破面観察および腐食電位、溶出イオン、表面の化学組成を測定した。

## 3. 実験結果

合金の寿命は、マルテンサイト相になると著しく低下することがわかり、合金相が腐食速度に関係していることが示唆された。破面解析から、局部腐食が原因であると推定され、高応力が負荷された状態では、腐食領域が狭くても破断に至ることがわかった。イオンの溶出は過酸化水素の添加により、促進すること、ニッケルイオンの溶出がチタンイオンよりも著しく多いこと、塩素イオンが腐食に係わっていることが確認された。

過酸化水素を含む生理食塩水に 24 時間浸漬した試料の AES の測定結果を未浸漬試料の測定結果と比較した結果(図)から、溶液に浸漬することにより、酸化膜が厚くなること、酸化膜中のニッケルの濃度が低くなることがわかった。以上の結果から、局部腐食が、合金の機能低下、イオン溶出の原因であることが推定された。この結果は、血管内から撤去したステントに見られると同様の表面局所腐食様式であった。

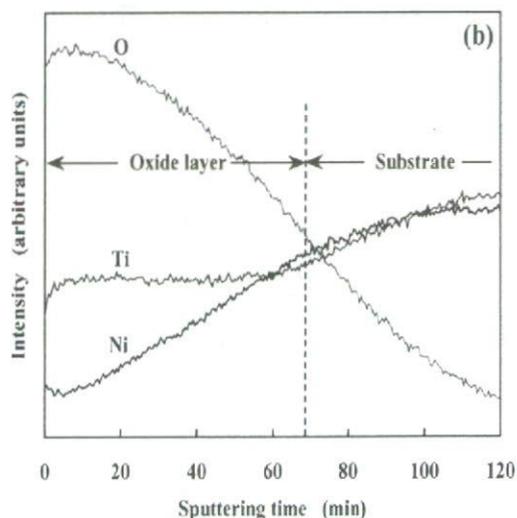
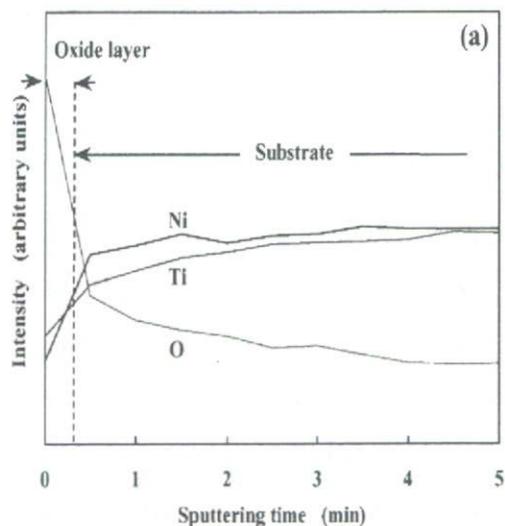
#### 4. 水素チャージと微粒子の発生

Ni-Ti 合金から溶出するニッケルイオン、チタンイオンが体内で金属水酸化物(腐食生成物)になるプロセス、物理、化学的環境条件で決まる腐食生成物の大きさ、そして溶出イオン、腐食生成物の生体反応を明確にすることは、体内埋め込み用 Ni-Ti 合金の安全性の担保に不可欠である。そこで、陰極通電法で試料に水素をチャージし、腐食生成物微粉末を作製した。その過程で溶出したニッケルおよびチタンイオンが水酸化物の微粉末になることを確認した。微粒子の粒度は 50 nm と 10-100  $\mu\text{m}$  付近の粒度であった。今後、実験条件と粒度の関係、腐食生成物の化学組成の特定を進め、Ni-Ti 医用合金の生体為害性を粘膜疾患、発癌性との関係で調べることにしている。

謝辞：本研究に協力された徳島大学助教 横山賢一先生(現：九州工業大学准教授)に謝意を表します。北大歯学研究科の宇尾基弘先生に粒度測定、組成分析でご協力いただきました。

#### 文献

- 1 Fracture of Ni-Ti superelastic alloy under sustained tensile load in physiological saline solution containing hydrogen peroxide. J Biomed Mater Res 82A(2007)558-567.



AES 分析結果：上図は未処理試料。下図は過酸化水素水を含む生理食塩水に 24 時間浸漬した後の試料<sup>1)</sup>

## 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

#### 1. 目的

一般に生体親和性を持つといわれている材料でも、そのサイズがマイクロ・ナノレベルになると細胞に対して刺激性を持つことがある。例えば、人工関節やインプラントなどの長期使用により磨耗粉が生じ、体内に取り込まれる可能性は否定できない。また、医薬・化粧品の分野でもマイクロ・ナノ粒子が広範囲に使用されてきている。それ故、我々は知らず知らずのうちにマイクロ・ナノ粒子に曝されている。そこで本研究では、生体内に取り込まれた無機粒子の体内での循環・滞留・排泄の追跡とその可視化のために、1) 投与(暴露)方法の検討、2) 投与粒子の検出・追跡を試みた。

#### 2. 実験方法

生体内でのマイクロ・ナノ粒子の分布・循環状態を調べるための試料投与方法として、a) 尾静脈注射(10 mg/mL, 0.6 mL)、b) 経口投与(10 or 50 mg/day, 10 days)、c) 肺への直接噴霧(1-2 mg)を試みた。実験対象としては、マウス(ICR系オス、8W-12W)を用い、投与後一定期間、経過観察を行なった。その後、エーテルにより安楽死させて開腹し、肺・肝臓・脾臓などを摘出した。各臓器を誘導結合プラズマ発光分析装置(ICP-AES、以下ICPと略記)、エックス線分析顕微鏡(XSAM)を用いて分析し、投与した金属微粒子の体内での分布・滞留の状態を確認した。ICP測定用の試料は、各臓器を全て摘出して800℃で灰化した後、硝酸で溶解した。XSAM測定の際には臓器をホルマリン固定した後、約2 mm厚の切片を作成し観察を行なった。またXSAMを用いてマウスの全身像を観察し、投与した微粒子の体内動態の可視化を試みた。

#### 3. 結果と考察

##### 1) 投与(暴露)方法の検討

###### a) 血中投与

尾静脈からの血中投与方法に関しては、観測系に対応した投与濃度、投与量についての検討はほぼ終了した。例えば、XSAMでの観察の場合、10 mg / mL の薬液 0.6 mL の投与により、測定に十分

な体内濃度が得られ、一方で数週間以上の経過観察にも絶え得ることが判った。測定系としてICPを用いる場合には、 $0.3 \text{ mg / mL} \times 0.6 \text{ mL}$  の投与でも十分に体内への滞留状態を観測出来ている。

#### b) 経口投与

経口投与に関しては、寒天に投与物質 ( $\text{TiO}_2$ , Pt) を  $10 \text{ mg}$ , および  $50 \text{ mg}$  混入させた試料を10日間給餌した。その後、XSAMにより体内への滞留状況を確認したところ、 $\text{TiO}_2$   $50 \text{ mg / day}$  の条件でのみ、脾臓などから $\text{TiO}_2$ が検出された。

#### c) 肺への直接噴霧

肺への投与に関しては、麻酔下のマウスの肺に投与物質 (Pt) を  $2 \text{ mg}$  乾燥粉末で投与し、1週間の経過観察の後、ICPにより体内への滞留状況を確認した。結果については、当日報告する予定である。

現状では、b), c) の投与方法については実験例が少なく、投与量などの最適化が今後の検討課題である。

### 2) 投与粒子の検出・追跡

投与粒子の体内での循環状態の追跡は、経過観察期間ごとの摘出臓器について、XSAM、ICPを用いて、分布の割合や各臓器への滞留量を測定し、その経時変化を観測してきた。その結果、一定期間は特定臓器に滞留し、その後各臓器へと循環していく物質 ( $\text{TiO}_2$ ) と、投与直後から各臓器に到達し、その存在比があまり変化しない物質 (Ptなど) とが、存在する事が示された。さらに滞留・循環の速度には、サイズ依存性があることも示された。また長期の経過観察により、投与粒子の総検出量には減少が見られることから、体外へと排泄される可能性を考慮して、現在、飼育期間中の糞・尿の回収・分析を検討している。

また全身の分布状態を確認する為に、 $\text{TiO}_2$ を投与したマウス(経過観察1日)を樹脂包埋し、 $5 \text{ mm}$ 厚に切断した試料を作成し、XSAMにより観察を行った(図1)。この場合、投与物質は肺と肝臓のみから検出され、他の臓器への到達は確認されなかった。

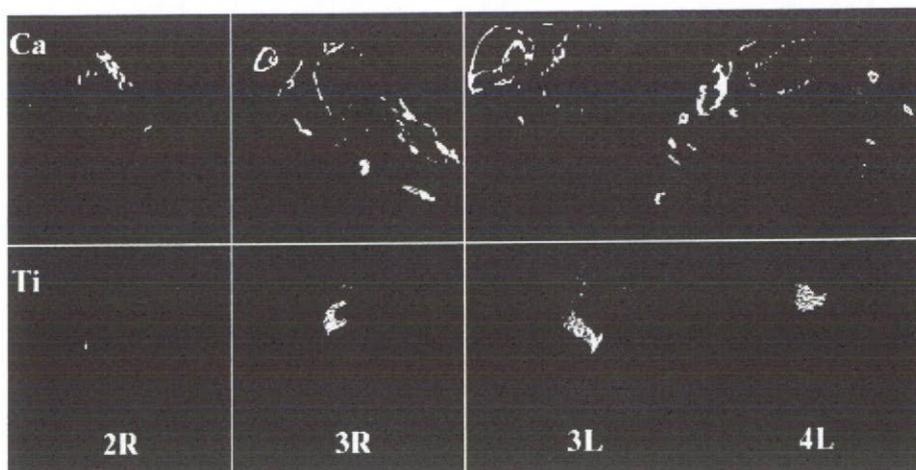


図1  $\text{TiO}_2$  ( $1 \mu\text{m}$ ) 投与後1日のマウスのXSAM像(樹脂包埋、矢状断)

# 新規DNAキャリア分子を用いたアンチセンス核酸療法の確立と 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

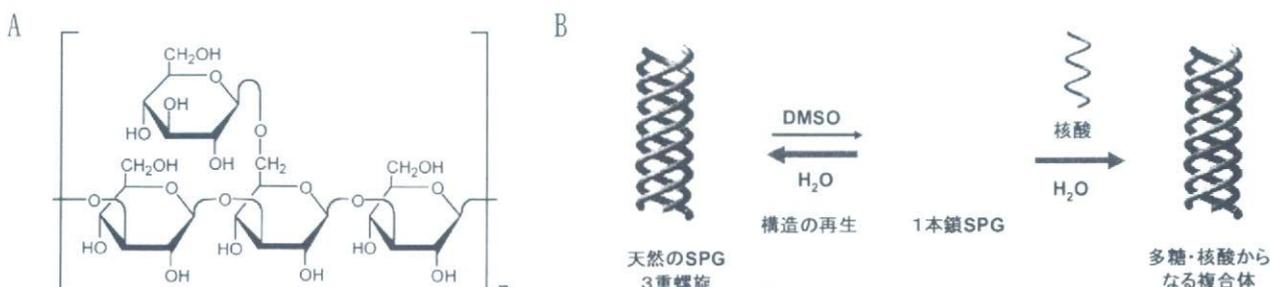
宇野 篤、安藤弘法

北九州市立大学国際環境工学部

櫻井和朗

(はじめに) アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS ODN) は標的分子のmRNAに結合して分解し、タンパクへの翻訳を妨げる。本法は特定の遺伝子発現を抑制するツールとして検討されてきたが、①体液中における、主としてヌクレアーゼによる加水分解による不安定性、②標的細胞における取りこみ効率の問題、により臨床応用は困難とされてきた。①を克服すべく様々なキャリア分子が開発されてきたが、カチオンリポソームはデリバリーや大きいサイズの点で取りこみの問題となることが多く、また合成ポリカチオンは有用であるが毒性や水溶性に問題があるため、無毒かつ細胞特異的なリガンドとして使用可能な天然多糖類がキャリアとして期待されている。シゾフィラン (SPG, Sonifilan<sup>®</sup>) は霊茸類 *Schizophyllum commune* より抽出された  $\beta$ -D-glucan であり、3つの  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan と1つの  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glycosyl 側鎖が繰り返し構造をとる (図1A)。SPGは水中では単鎖が会合してトリプルヘリックス構造を、DMSO中では解離してランダムコイル構造をとるが、再解合時に核酸が存在すると水素結合によりSPGとこの核酸が複合体を形成することが見出された (図1B)。この核酸-SPG複合体は非常に安定で水溶性であり、核酸に対する相補鎖の存在下や酸性条件下では容易に解離し、AS ODNキャリア分子として有利であると目されている。しかしAS ODNキャリアとしてのSPGのin-vivoでの有用性は未だ検討されていない。

図1



関節リウマチ (RA) は関節滑膜を病変の主座とし、関節炎と骨軟骨破壊により患者の著しいADL

障害と疼痛をもたらす。RAの病態にはTNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、MIFなど多様なサイトカインが関与することが知られており、これらは現在治療上の標的因子と位置づけられている。これらに対する中和抗体による治療法はすでに臨床応用がなされているが、ショックなどの重篤な副作用、生物製剤のためのコスト高、および抗-抗体の産生による効果の減弱等の問題点もあり、AS ODNによる炎症性サイトカインの阻害は有望な代替方法のひとつと位置づけられる。

以上をふまえ、本研究では1) AS ODN/SPG複合体の体液中での安定性、2) MIF AS ODN/SPG複合体のin-vitroでのMIF silencing効果、3) MIF およびTNF- $\alpha$  AS ODN/SPG複合体の関節炎モデルマウスに対する有効性、4) SPGの細胞内取りこみ機構の解析、以上を検討した。

#### (方法および結果)

##### 1. SPGの核酸キャリアとしての有用性；

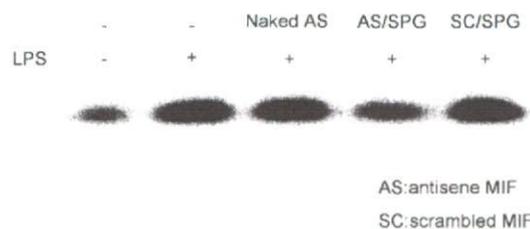
DNAの変性分解をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。AS ODN/SPG複合体はin-vitroでは37℃ヒト血清下においてnaked AS ODNに比べ安定であった。またAS ODN/SPG複合体およびnaked AS ODN 0.4mgを8週令のBALB/cマウス尾静脈より投与し、経時的に尾静脈より採血を行いDNAを抽出し同様に解析したところ、in-vivoでもAS ODN/SPG複合体はnaked AS ODNに比べ安定であった。

##### 2. SPGを用いた、MIFに対するAS ODNのin vitroにおけるsilencing作用；

MIF AS ODN/SPG複合体を用意し、このin-vitroでのMIF発現抑制効果を確認した。

マウスマクロファージ株RAW264.7に naked AS ODN, AS ODN/SPG, scramble ODN/SPGを添加し、20時間後LPS (1ng/ml)で刺激し、12時間後回収してcell lysateよりウエスタンブロッティングを行った。AS MIF dA30 (50nM)添加によりMIF発現は最大30%抑制された(図2)。

図2 MIF protein expression in RAW 264.7 macrophage cells treated with ASMIF/SPG complex

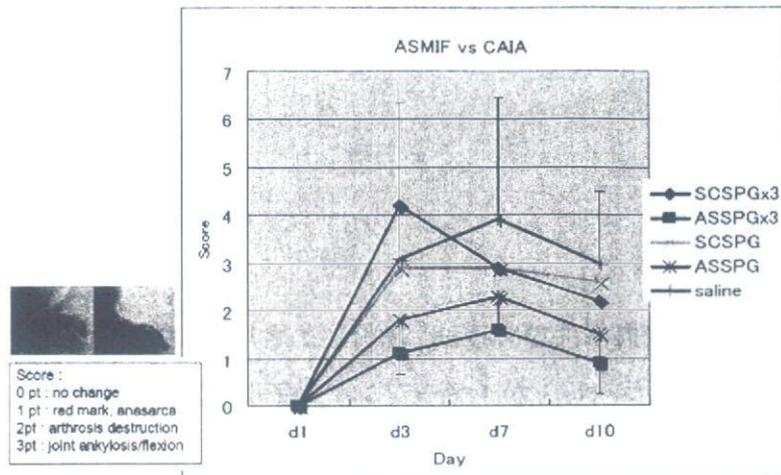


##### 3. MIFおよびTNF- $\alpha$ を標的とした、関節炎モデルにおけるSPG-AS ODNの抗炎症効果の検討；

関節炎のモデルとして抗II型コラーゲン抗体カクテル誘発関節炎モデル(CAIA)を用いた。6週令BALB/Cマウス♀を用い、saline、naked AS ODN、AS ODN/SPG複合体、SPG単独の4群(各群n=9~10)に分け、抗体カクテル投与3日後にLPS腹腔内注射およびAS ODN 2  $\mu$ gを静脈内投与し、経時的に関節炎の程度を評価した。MIF AS ODN およびTNF- $\alpha$  AS ODNいずれにおいてもAS ODN/SPG複合体投与群は関節炎スコア

が有意に抑制され、in-vivoでのSPGのAS ODNキャリアとしての有効性が確認された。

図 3



#### 4. AS ODN/SPGの取りこみ機序の検討；

SPGは抗原提示細胞の細胞表面に発現するreceptorであるdectin-1のligandであることが知られている。FITCでラベルしたDNAをnakedないしはSPG複合体にてRAW264細胞に添加し、24時間後回収しFACSにて取りこみを定量すると、SPG複合体はnakedにくらべ明らかに取り込みが増す。この際、抗dectin-1抗体を同時添加すると、核酸SPG複合体取り込み量がnakedと同程度にまで減少した。

(考察) 本研究により、SPGとの複合化によりAS ODNはin-vitroおよびin-vivoにて安定化すること、SPGにより複合化されたAS ODNはin-vitroにて実際にsilencing効果を呈すること、SPGにより複合化されたAS ODNはin vivoにて疾患治療効果を呈すること、およびSPGにより複合化されたAS ODNの細胞内取りこみ機構には抗原提示細胞特異的表面レセプターであるdectin-1が関与することが示された。SPGは核酸医薬の新規ドラッグデリバリーシステムとして有望であり、かつその標的細胞がマクロファージ・樹状細胞等の抗原提示細胞に限定されることで、これらの細胞のもつ特異的な機能に対する抑制効果を期待できる。さらに現在、SPGはsiRNAおよびペプチドとの複合化も可能である。炎症性疾患におけるマクロファージ、自己免疫疾患における樹状細胞の重要性はいうまでもなく、この方法がアドバンテージを發揮できる治療戦略は多岐に及ぶと思われ、今後の展開が期待される。

## 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

○ 荻澤 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

我々はフラーレン誘導体の修飾部位である  $sp^3$  結合にエネルギーを与えると、フラーレンと誘導体に解離することに注目し、フラーレンがイメージング分子として使用できることを提案してきた。今回は、水溶化フラーレン ( $C_{60}-(OH)_n$ ) を注入したラットの1時間後と24時間後の臓器の切片をイメージング質量分析することにより、 $C_{60}-(OH)_n$  の各臓器に対する分布を測定した。図1は水溶化フラーレン ( $C_{60}-(OH)_n$ ) を注入したラットの1時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトルである。肝臓の切片の質量スペクトルから、720 m/z に  $C_{60}$  (質量数 720) に相当

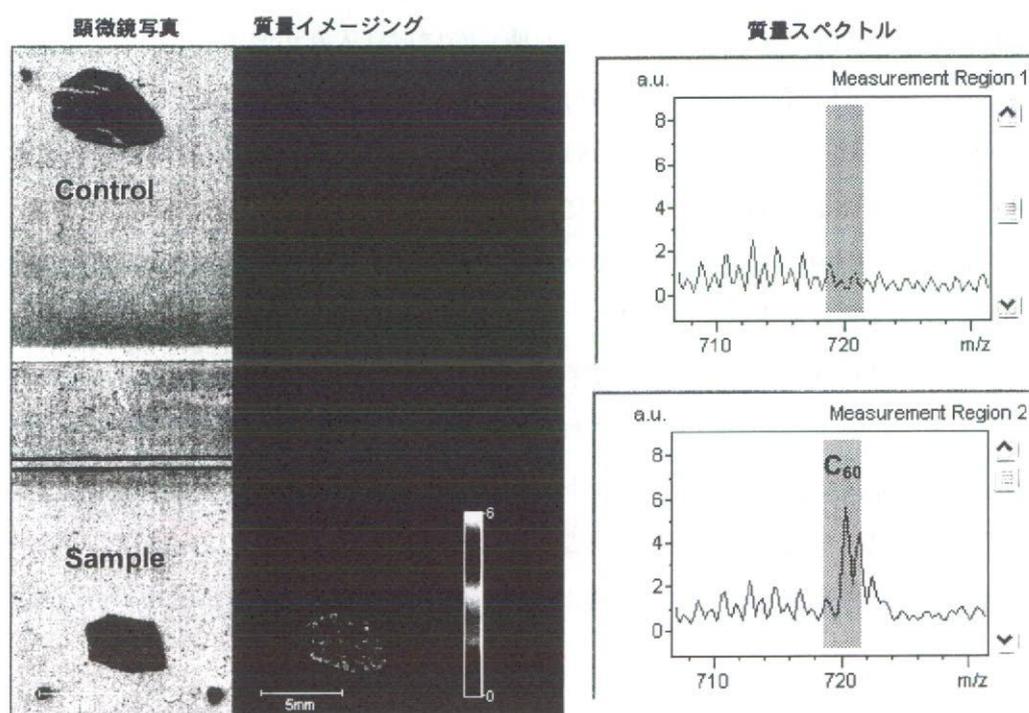


図1 水溶化フラーレン ( $C_{60}-(OH)_n$ ) を注入したラットの1時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。

するピークを検出し、フラーレン構造が壊れるときの特有なフラグメント  $C_2$  (24 Da) ロスも確認されたことから (図無し)、肝臓に  $C_{60}-(OH)_n$  が存在することが示唆される。その分布は質量イメージマッピングから示されるように、肝臓切片に満遍なく存在していることが確認できた。

# 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

北海道大学大学院歯学研究科

赤坂 司、横山 敦郎、土屋のりか、松岡 真琴、阿部 薫明、宇尾 基弘、亘理 文夫

東北大学 大学院環境科学研究科

佐藤 義倫、田路 和幸

株式会社 名城ナノカーボン

橋本 剛

## 1. 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解明してきた。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、さらなる詳細な検討が望まれる。

本研究では、CNTのバイオ分野におけるさらなる応用展開を目指し、単層カーボンナノチューブ透明導電性薄膜での培養を検討し、①多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での詳細な基礎的比較検討、②市販細胞培養用基材との比較によるカーボンナノチューブ培養基材の位置づけ、③カーボンナノチューブの新たな機能の発見を焦点に置き、検討を行った。

## 2. 実験方法 (一部抜粋)

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) および多層カーボンナノチューブ (純度80%以上、NanoLab製) を分散液に加え超音波処理を十分行い、6cmのポリスチレンディッシュ (for suspension culture、Corning社製) に薄層コートした。その後、乾燥、UV滅菌し培養に使用した。

細胞培養は、ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞であるSaos2を用い、DMEMに0.1-20%FBS (通常、10%FBS) および1%PSNを添加した培地にて、37℃で5%CO<sub>2</sub>環境下にて所定時間行った。細胞数は光学顕微鏡下にてのカウント、またはDNA定量により行った。細胞の観察は、2.5%グルタルアルデヒド

による固定後、一般的な脱水・乾燥条件で行い、走査型電子顕微鏡にて行った。

### 3. 結果と考察（一部抜粋）

単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブをコートしたポリスチレンディッシュをSEMにて観察した結果 (Fig 1)、いずれの基材においてもカーボンナノチューブ凝集による凹凸の比較的に少ない表面状態が観察された。単層カーボンナノチューブはバンドルとしてポリスチレン表面に吸着しており、SWNT10 (10 $\mu$ g/dish) では多くのポリスチレン表面が露出しているのに対し、SWNT100 (100 $\mu$ g/dish) ではほぼ表面を覆っている状態が観察された。

カーボンナノチューブコート量が細胞増殖に与える影響を検討した結果、単層カーボンナノチューブおよび多層カーボンナノチューブの両方においてコート量が10 $\mu$ g/6cm dish以上で良好な細胞増殖が観察された。細胞増殖率は、単層カーボンナノチューブ>Culture dish>多層カーボンナノチューブ>Normal dish（無処理）であった。特に単層カーボンナノチューブは細胞増殖に有利であり、炭素による適度なナノレベルの凹凸、タンパク質吸着量および強さなどの効果であると推測される。

以上の培養試験の結果（一部抜粋）より、詳細な基礎検討を行うと各培養基材の違い（特性）が明白となった。さらに他の特性を検討することにより、用途に応じた使い分けが可能となると考えられる。



Fig 1. SEM images of SWNT conductive thin film on PS dish (SWNT10: 10 $\mu$ gCNTs/6cm dish, SWNT100: 100 $\mu$ gCNT/6cm dish)

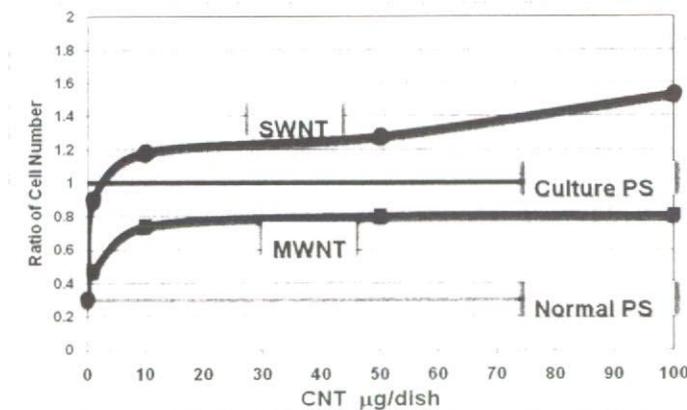


Fig 2. Effect of CNT amount on proliferation of Saos2 cell.

# カーボンナノチューブ産業応用関連の最新話題

—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—

北海道大学大学院地球環境科学研究院

○古月文志

## 1. カーボンナノチューブが持つ真の価値が問われるリアルナノ時代

2月13日～15日東京国際展示場で開催された nano tech 2008展示会に参加した。ナノテクノロジーはブームから実用化へ進化し、カーボンナノチューブも話題性から応用段階に突入した。単層カーボンナノチューブを利用した透明導電フィルムや多層カーボンナノチューブを用いた面状発熱体をはじめ、様々な機能性製品の実物が展示された。クラレリビング株式会社・茶久染色株式会社・三井物産株式会社・北海道大学が共同で開発した「カーボンナノチューブ染色糸(商品名: Carbon Nano Tube Electro Conductive & Coating Network Technology, CNTEC)」は、カーボンナノチューブの応用範囲を日常生活の領域までに拡大させた実例として、参加者に強烈なインパクトを与えた。ブーム沈静化で真の価値が問われるリアルナノ時代でこそ、カーボンナノチューブを使用した製品のアドバンテージが求められている。

## 2. カーボンナノチューブ染色糸 (CNTEC) の特徴

「優れた導電性」CNTECは、カーボンナノチューブによる形成される連続したCNT-nano-netが「交差したナノ導電回路」を形成し、電子の流れをスムーズに導くことができる。このような連続に繋がっているCNT-nano-netは、「トンネル効果」と呼ばれる特殊な性質を持っているので、大量の電流が通過しても、オーバーヒートされることなく、導電回路として機能する。CNTEC糸を少量に衣服に織り込むだけで、医療機器の誤動作や電子データ消失の原因となる帯電を防ぐことができる。

「高い耐久性」厚さが数十～数百ナノメートルのCNT-nano-netを、直径約10  $\mu\text{m}$  の繊維の表面に脱落することなく連続的に形成・固定するためには特殊な技術が求められている。伝統的な「糸染色技術」を駆使し、長さが数千メートル又は数万メートルにも及ぶCNT-nano-netを極細繊維の表面に連続的に形成・固定することができる。ポリエステル糸を原糸として用い、作製したカーボンナノチューブ染色糸は、130℃の高温水で30分間、洗濯処理した後、CNT-nano-netがしっかり維持していたことが判った。

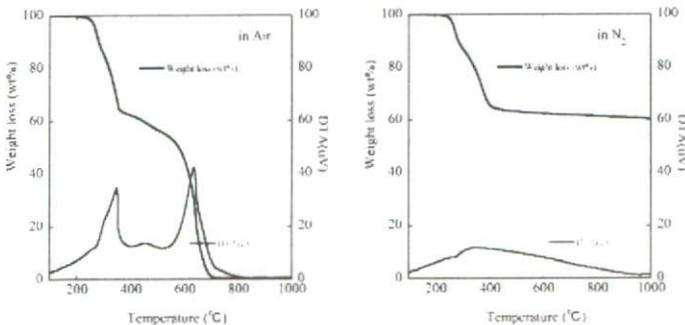
「ソフトな風合い」これまでは様々な導電性糸が開発されていたが、モノフィラメント(太い1本の糸)が主流であり、ソフトな風合いを持つマルチフィラメント(極細繊維の集合体をベースとした1本の糸)導電糸の生産が極めて困難であった。カーボンナノチューブ染色技術はマルチフィラメント糸にも適用するので、CNT-nano-netを「導電回路」とするソフトな風合いを持つ導電糸を創出することができる。

### 3. 染料としてのカーボンナノチューブ孤立分散液

「大量処理可能な分散技術」カーボンナノチューブは、通常、凝集体として存在する。カーボンナノチューブの凝集は、その表面の原子が配位的に不飽和であるため、隣接同士に配位して、ファンデルワールス力による安定化エネルギーを獲得することによって起きる。カーボンナノチューブの構造特徴を最大限に発揮させるためには、まず、互いに凝集しているカーボンナノチューブの塊を1本ずつにほぐす必要がある。言い換えれば、たとえカーボンナノチューブが使われていたとしても、凝集状態であれば、ナノ構造体としての性質・特性が殆ど現れてこないことになる。カーボンナノチューブを「染料」として用いた場合においても、まず、その塊（粉体）を1本1本にほぐす処理、つまり、孤立分散処理を行う必要がある。また、製造コストを抑えるためには、カーボンナノチューブ粉体を短時間で大量に分散処理できるプロセスが求められる。以下に、カーボンナノチューブ染色系を作製するための「染料」として用いた「BF分散液」について簡潔に紹介する。カーボンナノチューブ凝集体をほぐすための「主分散剤」、主分散剤の分散効果を高めるための「分散補助剤」および分散されたカーボンナノチューブの再凝集を防ぐための「安定剤」をそれぞれ配合した「BF分散液」を、カーボンナノチューブ粉末と混合した後、30分～90分、緩やかな剪断力を加えるだけで、カーボンナノチューブが1本1本になった真の孤立分散液が得られる。実験室のレベルでは、一日、500～1000グラムのカーボンナノチューブ粉末を分散処理することができる。スケールアップして、量産ラインへの拡大も可能である。単層カーボンナノチューブおよび多層カーボンナノチューブの両方の孤立分散に対応でき、重量パーセント20wt%カーボンナノチューブ（多層タイプ）分散液を作製することができる。

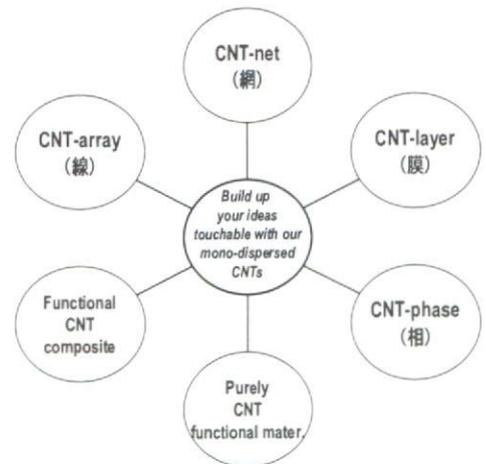
「分散液におけるカーボンナノチューブ濃度の決定」分散液に含まれているカーボンナノチューブの量（重量パーセント）を正確に決定するためには、示差熱天秤（Thermogravimetry, TG）法を用いた。以下はその測定結果を示す。含有量が5.02～5.17 wt%であることが判る。

1. 5.0% CNT分散液: 6.7005g → (120°C, 4.0h/6.0h) CNT分散液の固形分: 0.5723g
2. CNT分散液の固形分含有量: 8.54wt%
3. TGの測定 (CNT分散液の固形分は原料として利用した)



4. In air: 600°C付近にCNTの分解に由来した重量減少は約58.8wt%。
5. In N2: 550°C以後の重量残留には凡そ60.6wt%。
6. CNT分散液のCNT含有量: 5.02wt% (Air中でのTGデータより算出) もしくは 5.17wt% (N<sub>2</sub>中でのTGデータより算出)

#### 孤立分散カーボンナノチューブ



# 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

## 1. 目的

歯科診療の現場では、歯質やレジン、金属、陶材など様々な材料を高速回転切削器具を用いて切削・研磨する。ほとんどの場合、これらの作業は口腔内で行われ、切削片や磨耗粉は唾液や水とともに口腔内に貯留することとなる。これらは口腔内バキュームによって吸引・除去されるが、その一部が嚥下などによって患者の体内に取り込まれることがある。歯科治療に用いられる材料にはアレルギーを誘発する物質も存在し、また、切削作業により器具そのものに刃こぼれを生じることもある。本研究では、これらの物質が体内に取り込まれた際に生体に及ぼす影響を明らかにするため、切削粉の観察を行った。また、それらマイクロ・ナノ粒子の生体内での動態の可視化法の一つとして、マウスに投与したナノ粒子の磁気共鳴画像法(MRI)による観察を試みた。

## 2. 実験方法

・観察用の切削粉を得るため、抜去歯牙及び歯科用金属(铸造用金銀パラジウム合金:金パラ)それぞれを、歯科用エアタービンと切削工具(通常切削用ダイヤモンドポイント:DP、カーバイドバー:WC)を用いて清潔なポリ袋の内部で切削した。発生した切削粉を水とともに回収し、得られた試料を粒度分布測定装置・SEMを用いて観察した。以下、被研削材と切削工具の組合せを、歯/DPの要領で略記する。

・マグネタイト粒子(粒径約10nm)のけん濁液をマウス尾静脈から血中投与し、7 Teslaの動物用MRI(Varian社製)を用いて吸入麻酔下で測定した。測定条件はTR/TE = 5000/20 ms, matrix 256 x 128, field of view 80 x 40 mm<sup>2</sup>, スライド厚 1mmで行った。

## 3. 結果と考察

### ・切削粉塵

図1、2に示したように切削粉のサイズと形態は切削工具と被研削材の組み合わせにより大きく異なった。金パラ/DPでは、平均粒系100 $\mu$ m程度の鉋屑状の切削片が多く見られた。金パラ/WCでは、平均粒系は100 $\mu$ m程度であるが不定形の切削片が観察された。一方、歯牙を切削した歯/DPの場合には、数~数十ミクロン(平均:10 $\mu$ m程度)の不定形の切削片に、更に細かな粒子が付着している様子が観察された。これまでの研究で、十ミクロン以下の物質は

その素材に依存せず、細胞に対して刺激性を示すことが示唆されている<sup>1,2)</sup>ため、これら切削粉について今後更なる検討が必要であると考えている。

歯科診療時において、今回観察したような切削片・研磨粉の一部は口腔内パキュームによって除去し切れず、唾液や水とともに嚥下された後、体内に取り込まれている可能性がある。また、診療中に生じた切削粉はエアロゾルとして診療室内に浮遊し、それらを患者・術者ともに吸入している可能性もあるため、呼吸器系に及ぼす影響についても考慮する必要がある。

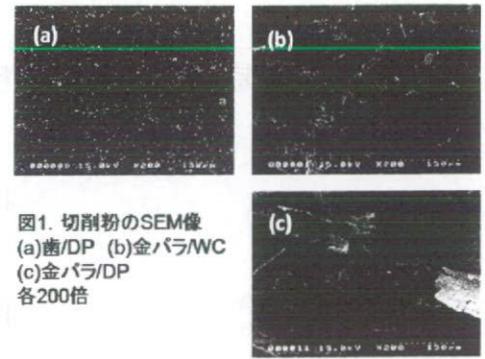


図1. 切削粉のSEM像  
(a)歯/DP (b)金パラ/WC  
(c)金パラ/DP  
各200倍

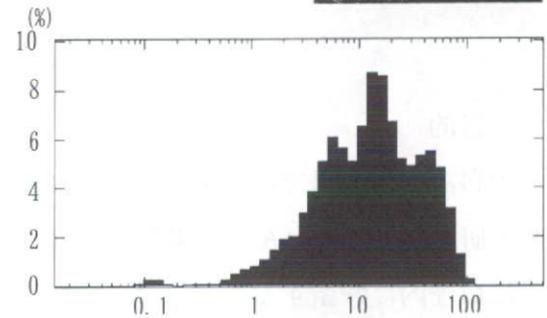


図2 歯牙切削片の粒度分布測定結果

#### ・マイクロ/ナノ粒子の体内動態の可視化

切削粉塵などを始めとするマイクロ/ナノ粒子が体内に取り込まれた際の体内動態を可視化する手法として、現在MRIの利用を検討している。MRI法のメリットとしては、試料の体内分布について3次元的な画像情報が得られること、試料を投与した同一の被験体について、径時的な観察が可能であること、などが挙げられる。一方で、追跡対象となる試料はMRI信号に影響を与える（造影効果を持つ）磁性体、および磁性体を付加した物質に制限される。

今回はマウス尾静脈よりナノマグネタイト粒子を血中投与し、その体内での動態の追跡を行なった。図3に示すように、投与後に肝臓において輝度の低下が見られる。これはマグネタイトが血流に乗り肝臓へと到達したために、臓器周辺のMRI信号強度が減少したことを示している。そのほか、脾臓や腎臓へもマグネタイトが到達した様子が観測されている。また、投与後数時間のうちに各臓器でのMRI信号強度が経時的に減少しており、マグネタイトが徐々に臓器へと到達している事が示唆された。今後は呼吸による体動や投与方法など様々な技術的問題点の改善をしつつ、得られる情報の高度化・長期の経過観察の実現に向けて検討を行っていく。

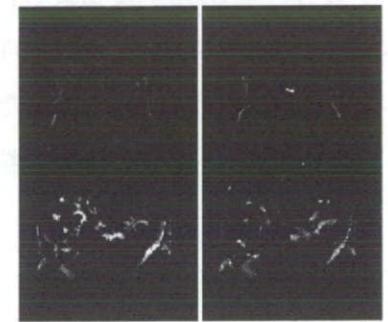


図3 ナノマグネタイト投与前後のマウスのMRI (左:投与前, 右:投与後)

#### [参考文献]

- 1) 巨理文夫, バイオマテリアル -生体材料-, 2006, 24-5, 300-310
- 2) Fumio Watari, Shigeaki Abe, Chika Koyama, Atsuro Yokoyama, Tukasa Akasaka, Motohiro Uo, Makoto Matsuoka, Yasunori Totsuka, Mitsue Esaki, Manabu Morita, and Tetsu Yonezawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 2008, 116(1), 1-5

## ゾウリムシの X 線顕微鏡による観察—II

矢田慶治<sup>1</sup>、斎藤泰<sup>1</sup>、阿部大基<sup>2</sup>、芳賀信幸<sup>2</sup>

<sup>1</sup>株式会社東研、<sup>2</sup>石巻専修大・理工

### X-Ray Microscopic Observation of *Paramecium*—II

Keiji YADA<sup>1</sup>, Yasusi SAITO<sup>1</sup>, Taiki ABE<sup>2</sup> and Nobuyuki IIAGA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Token CO., Technical Center II, Choufu, Japan

<sup>2</sup>Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki, Japan

[目的] ゾウリムシは、細胞性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、そのうち生きて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。充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昨年の研究会で報告したが、自然乾燥によるサンプルであったため内部構造が充分見えなかった。今回はオスミウム酸もしくは glutaraldehyde で固定してから臨界点乾燥もしくは凍結乾燥をしたサンプルを用いた。

[試料及び方法] 以下の 3 種類の試料を用意した：1) 通常の方法で培養したゾウリムシ (NH<sub>2</sub>) をオスミウム酸で固定し、臨界点乾燥をしたもの、2) オスミウム酸で固定し、t-ブチルアルコールで置換したものを凍結乾燥したもの、3) glutaraldehyde で固定し t-ブチルアルコールで置換後凍結乾燥したものである。これらの試料の 1 匹を PVF 膜を張った電顕用のメッシュに立体顕微鏡下で載せて観察した。観察には 0.1 μm の分解能を持つ X 線顕微鏡 TUX-5000F と走査型電顕 DS-130 を使い、同一場所の SEM 像と X 線顕微鏡像の比較を行った。

[結果] 図は、Au-target (200nm), 10kV で観察した SEM による X 線像である。前面にわたるひげ状の構造と内部の器官と思われる構造が見られるが、前回の自然乾燥によるものと比べると全く異なる構造である。更に多くの個体について調べる必要があり実験を続けている。



# 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学研究室

○大貫惣明 奥寺公也 浜田弘一 須田孝徳 橋本直幸

**Abstract.** “Environmental cell” microscopy was applied for surveying gas reaction of hydrides in magnesium base alloys, which are candidates for hydrogen storage materials in advanced hydrogen energy systems. In order to clarify the mechanism of hydrogenation process, in-situ experiment has been carried out by using a 200 kV transmission electron microscope (TEM) equipped with a newly developed environmental cell, which is capable to 0.1 MPa in the temperature range between R.T. and 200°C. When hydrogen gas reacted with magnesium powders, straightening of surface steps (60~70 nm in height) was observed, indicating that swelling due to volume expansion occurred. In addition, the formation of MgH<sub>2</sub> was indicated in SADP. The precise study on this in-situ experiment, as well as its improvement, will be continued, especially using transparent films.

## 1. 緒言

次世代のエネルギーメディアとして水素への期待は大きく、その貯蔵手段の一つとして水素吸蔵合金がある。今日、様々な水素吸蔵合金の研究開発が行われているが[1-2]、材料の評価や制御を目的とした水素化反応過程のナノレベルでの解析はほとんど行われていない。本研究では電子顕微鏡内に水素ガス雰囲気構築するためのTEM用環境セルの開発を行い、高水素容量の水素吸蔵合金であるMg-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の水素化反応をその場観察し、その変化を考察した。

一方、透過電子顕微鏡によるその場観察のためのハードウエアとして環境セルの歴史は結構古く、500°Cで3kPaの酸素環境で超高压電顕中でのNi-Cr合金の酸化についてのその場観察がある[3]。モリブデン酸ビスマスについて400-500°Cで100TorrのC<sub>3</sub>H<sub>6</sub>ガス環境での触媒反応が報告されている[4]。また150K以下での6フッ化硫黄ガスからの結晶化のその場観察も明らかにされている[5]。開放型環境セルを使った水素ガス環境下での引っ張り試験のその場観察も行われている[6]。

このように環境セルによる種々の研究はあるが、水素吸蔵材料についての研究は行われていない。したがって、本研究では、電子顕微鏡本体の改造を必要としないクローズ型の環境セルを製作し、Mg系の水素吸蔵材料の水素化反応のその場観察することを目的とした。あわせて、大気圧あるいは水蒸気雰囲気での観察の可能性についての検討も試みた。

## 2. 方法

### 2.1 新規作成した環境セルの概要

作成した環境セルは汎用型の200kV電子顕微鏡(JEOL2010)用であり、軸部はアルミニウム製、試料保持の先端部は真鍮製である。ガス導入部はステンレスパイプであり、ホルダーの軸部を貫通している。図1はホルダー先端部の外観を示す。この環境セルはクローズ型であり、0.2mm厚さのOリング3枚とCuグリッド上の隔膜によって気密が保たれている。隔膜はトリアセチルセルロースとカーボン補強膜から成り立っており、2気圧(0.2MPa)の空気あるいは水素に耐えることが出来た。電子線に対して

はほぼ透明であり、電子線回折像でもわずかにハローリングが見られるのみである。本研究ではこの隔膜の製作がもっとも技術を要し、トリアセチルセルロースとカーボン補強膜の組み合わせではもっとも安定したものを得ることが出来た。図2は水素供給部である。真空排気はターボポンプとダイアフラム型ポンプを組み合わせ、油汚染を避けた。水素源はLaNi5を含んだ水素吸蔵タンクであり、室温でも一定圧の高純度水素を得ることが出来た。図3はトリアセチルセルロース膜(20nm)、カーボン補強膜(50nm)とCuグリッド(200nm)の関係を示すものである。この組み合わせは試行錯誤で得られたが、電子線に対しては安定した挙動を示した[7]。

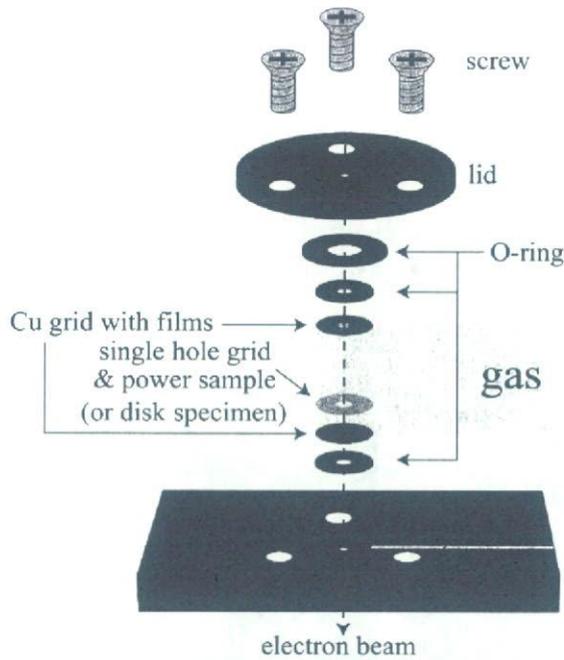


Figure 1. The schematic view of the nose of environmental cell holder

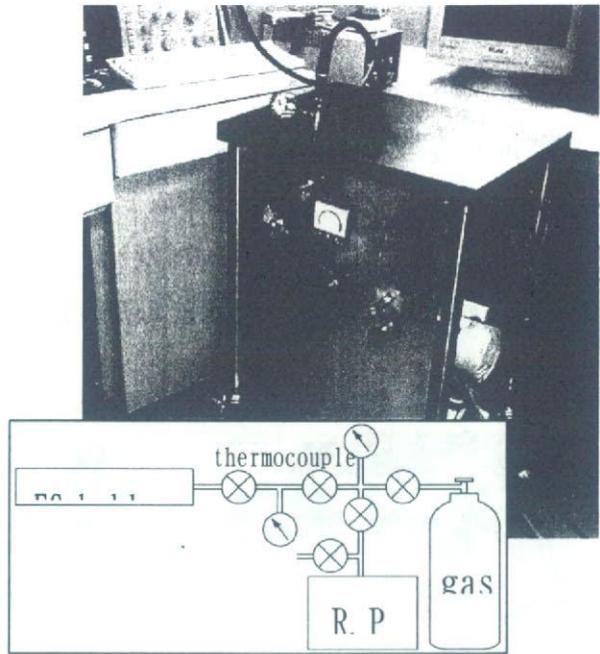


Figure 2. Photograph of the gas-control part and schematic view of a gas-control system

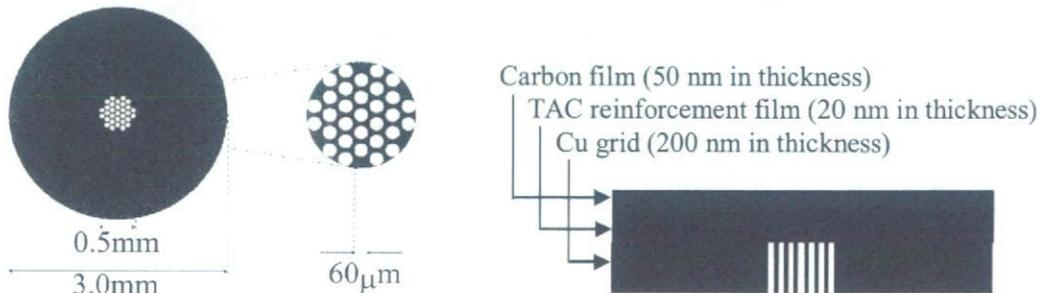


Figure 3. The schematic view of an electron-transparent grid

## 2.2 試料作成と装填

試料はMgに触媒として1wt.%のNb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>が添加されたMg-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>粉末を用いた。調整は水素ガス雰囲気

ボールミル混合 (MA) である。観察に用いた粉末はおおむね0.1ミクロン以下のものであり、酸化を防ぐため、Ar雰囲気グローブボックス中で環境セル内に装填した。

環境セルホルダーはまずアルコールで超音波洗浄し、55℃の真空中で1時間保持して、吸着ガスを除去した。粉末試料はCuグリッド中に付着させ、隔膜に直接触れないようにセッティングした。これは隔膜が破れるのを防止するのに大いに役立った。ちなみにこの隔膜は電子顕微鏡内の真空雰囲気に対して0.2MPaの大気にさらしても破れることは無かった。

その後、加速電圧200kVの汎用型TEMを用いて室温の水素雰囲気中で連続的に明視野像と電子線回折パターンを撮影を行った。

### 3. 結果と考察

図4はMgの微粒子の真空および0.1MPaの水素ガス雰囲気での明視野像と対応する電子線回折パターンである。微粒子は水素の導入により若干膨張した。20分までの観察ではその外形は10%ほど増加し、これは40%程度の体積膨張に相当する。MgH<sub>2</sub>の等方的な結晶構造を考慮すると30%程度の膨張が期待される。電子線回折の結果はMgH<sub>2</sub>の形成を示唆している。

なお、この環境セルでは0.2MPaの大気でも使用できることが確かめられたため、室温から200℃の範囲であれば大気環境あるいは水蒸気環境での観察は可能と思われる。

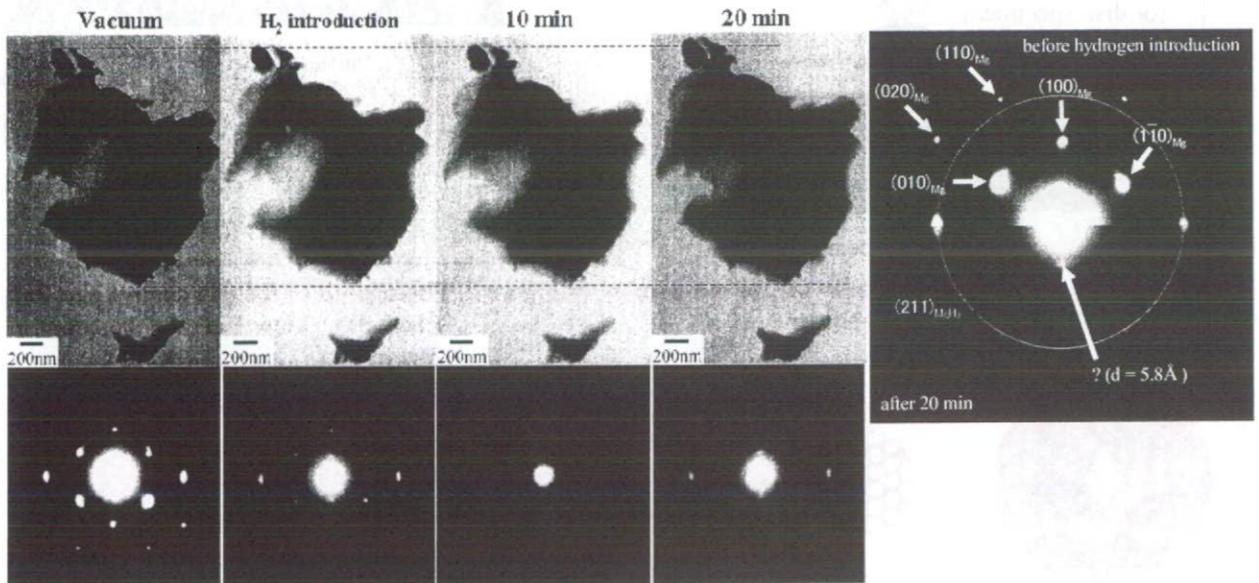


Figure 4. BF and SADP of Mg particles before and after introducing hydrogen.

### 4. まとめ

本研究では電子顕微鏡内に水素ガス雰囲気を構築するためのTEM用環境セルの開発を行い、高水素容量の水素吸蔵合金であるMg-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の水素化反応をその場観察し、その変化を検討した。製作した密閉