

out from the freezer, they were kept on the ice, prepared in advance. And then 0.5ml 0.2% triton was put into each well with samples in the plates. The plates were shook gently for 45min. Finally, the triton solutions with lysed cells were analyzed for DNA, ALP and protein content.

DNA content was mensurated with the CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen) according to the guideline of the company. 0.1ml of each sample (n=4) were diluted in the lysis buffer, which was included in the Kit, to a final volume of 1.0ml test tubes. Then 1.0ml of aqueous working solution (dye) was added to each sample. After the tubes were incubated for about three minutes, the fluorescence using instrument parameters was measured at an emission wavelength of 520 nm and excitation of 480 nm. The DNA content of cells attached on the porous samples was counted through a premade standard DNA curve. DNA content was expressed as mean \pm SD.

For the determination of ALP content, 20ul of each sample (n=4) was added to the wells of a 96-well plate and then 100 μ l Paranitrophenylphosphate (PNP) solution was added. After shaken gently, the plate was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 15 min. After 80 μ l stop solution (0.2mol/L sodium hydroxide) was added, the plate was read with a BIO-TEK automate microplate reader at 405nm. For the standard curve, serial dilutions of p-Nitrophenol were made. Finally, the ALP content of cells was counted through the standard curve. The value was expressed as mean \pm SD.

For the determination of protein content, 100ul of each sample (n=4) was added to the wells of a 96-well plate and then 100ul bicinchoninic acid (BCA) solution was added. Then, the plate was continuously shaken for 2 hours in dark at room temperature. Finally, the protein content was mensurated with the QuantiProTM BCA Assay Kit (TaKaRa BIO INC, Japan) according to the guideline of the company. The protein content, expressed as mean \pm SD, was counted through a premade standard protein curve.

Osteonectin, osteopontin, osteocalcin gene expression

Cell lysate was collected after week 1 and total RNA was isolated and purified with RNeasy columns (Qiagen, Basel). The isolated RNA was reversed transcribed to cDNA with the StratScript enzyme (Stratagene, San Diego,

CA). Quantitative real time RT-PCR (Taq Man ABI Prism 7700, Applied Biosystem, Foster City, CA) was used to measure the gene expression of osteonectin, osteopontin, osteocalcin, and a housekeeping gene (18S) using Amplifluor Universal Detection System (Intergen, Purchase, NY). Primers were designed with the Software Primer Express (Applied Biosystem). Primers were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Use of 18S allowed the different samples to be normalized and compared between experiments.

Cell culture on the samples after adsorbing rhBMP-2

At first, the samples were respectively immersed in rhBMP-2 (Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) solutions (rhBMP-2 in the cell culture medium) with concentration of 500ng/ml for 24 hours in an incubator at 37 $^{\circ}$ C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air. Then, the solution was completely removed and the samples were washed by the cultured medium of SaOS2 with 1% FBS for 3 times. And then, the cells were respectively cultured on the samples with a cell density of 5.0×10^4 per sample. After cell culture in culture medium with 1% FBS for certain time, DNA, ALP and total protein content were examined with the methods mentioned above.

Statistical Analysis

Obtained data were statistically analyzed with one-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by a Tukey's post hoc test (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). P<0.05 was regarded as significant difference.

C. 研究結果

Fig.1 showed the SEM images of the compacts. The distinct difference in the structures of the MWCNTs and GP compacts were exhibited. MWCNTs formed a packed meshwork nanostructure, while GP compacts were formed with particles of about 4.5 μ m. The ability of protein adsorption of the compacts was shown in Fig.2, which showed that MWCNTs compacts had much bigger ability to adsorb protein than GP compacts. Although the mean value of the protein adsorption of GP compacts was bigger than that of the culture plates (control), the statistical analysis showed that there was no significant difference between the two group values (P>0.05).

Fig. 3 showed the results of ALP/DNA (alkaline phosphatase per unit cell). ALP/DNA of the SaOS2 cells cultured on MWCNTs compacts was significantly higher than that on GP compacts and on the plates at each culture time point of 1, 7 and 14 days, whereas this value for GP compacts and the control had no significant difference at each time point.

TP/DNA (total protein content per unit cell) was shown in Fig. 4. TP/DNA of the SaOS2 cells on MWCNTs was significantly higher than on GP and the culture plates at each culture time point of 1, 7 and 14 days. At day 14, the value for MWCNTs was about two times as that for GP. Although the mean value for GP compacts was bigger than that for the control at day 7 and 14, the statistical analysis showed that there was no significant difference between the two group values ($P>0.05$).

As shown in Fig. 5, statistically higher osteonectin, osteopontin, and osteocalcin gene express of the SaOS2 at day 14 on MWCNTs than on GP scaffolds was found ($p<0.05$). There was no significant difference in the osteonectin, osteopontin, and osteocalcin gene expression of the SaOS2 at day 14 between on GP and control ($P>0.05$).

Fig. 6 showed ALP/DNA of the SaOS2 cells on the samples after adsorbing rhBMP-2 at day 7 and day 14, comparing with the results of the conventional cell culture. ALP/DNA of the cells on all the samples all increased after the adsorption of rhBMP-2. But the value for MWCNTs increased significantly most. The value for GP and the control had no significant difference even after the adsorption of rhBMP-2 ($p>0.05$).

TP/DNA of the SaOS2 cells on the samples after adsorbing rhBMP-2 at day 7 and day 14, comparing with the results of the conventional cell culture, was shown in Fig. 7. TP/DNA of cells on all the samples all increased after the adsorption of rhBMP-2. But the value for MWCNTs increased most observably. The value for GP and the culture plates had no significant difference even after the adsorption of rhBMP-2 ($p>0.05$).

Fig. 8 showed osteonectin, osteopontin, and osteocalcin gene express of the SaOS2 cells on the samples after adsorbing rhBMP-2 at day 14, comparing with the results of the conventional cell culture. Osteonectin, osteopontin,

and osteocalcin gene express of the cells on all the samples all increased after the adsorption of rhBMP-2. But the value for MWCNTs increased significantly most. The value for GP and the control had no significant difference even after the adsorption of rhBMP-2 ($p>0.05$).

D. 考察

Because CNTs have high elastic module, approaching 1 TPa, and exceptional tensile strengths, ranging from 20 to 100 GPa, use of CNTs in the biomaterials, such as ceramics and polymers, applied to bone is anticipated to improve the overall mechanical properties for applications, such as high-strength arthroplasty prostheses expected to remain in the body for a long time or fixation plates and screws that will not fail or impede healing of bone. In these cases, the effect of CNTs on the performance of osteoblasts seems most important.

It has been indicated that the biological response of cells to implanted material is determined not only by its chemistry, but also by structure. The nano-dimensionality of nature has logically suggested that nanostructured biomaterials should have positive effect on the cell functions.

Carbon nanotubes and GP are both isomorphs of pure carbon, composed of the same grapheme sheet structure. However, only carbon nanotubes are nano-scaled. So in this study, comparison of the influence of carbon nanotubes and GP on osteoblast-like SaOS2 *in vitro* was done to figure out the effect of carbon nanotubes on cellular functions. Meanwhile, we used cell culture on the culture plate as a control.

Cell differentiation should be most important evaluation point for biomaterials because it may directly contribute to the tissue repair. The satisfactory differentiation and maturation of osteoblasts is essential for the bone tissue regeneration. So in this study our focus has been on the effect of carbon nanotubes on the maturation of the cultured osteoblasts. It may be the first time that the effect of carbon nanotubes on the osteogenic maturation, especially the osteoblastic gene express of osteoblasts was researched.

ALP, a noncollagenous protein, is a highly specific marker of bone formation, osteoblast function and a

significant predictor of osteogenic cells formation. In this study, we used ALP/DNA to express the ALP activity per cell, thereby to characterize the ability of bone formation of each cell. Furthermore, ALP is one kind of protein and only account for small ratio of total proteins in cells. Besides ALP, there may be some others proteins, which may be markers of osteogenic cells formation. Evaluating total proteins (TP) in cells may be an effective method to evaluate the potential differentiation of cells. So, in our study, TP/DNA was used as an additional marker of the activity per unit cell for the potential cell differentiation.

The osteocalcin, osteopontin and osteonectin are important osteoblastic markers and are expressed at different maturation stages of the osteoblasts. These three genes have been shown to be differently involved in the bone mineralization process. Osteocalcin, which is the most osteoblast-specific gene yet known, has been demonstrated to stimulate bone mineral maturation. Osteopontin has been shown to inhibit the crystal growth of hydroxyapatite e.g., while osteonectin has been suggested to promote collagen mineralization.

From the results of conventional cell culture, we found the ALP/DNA of SaOS2 cells on MWCNTs was significantly higher than on GP and the culture plates, suggesting MWCNTs induce this kind of cell to differentiate into osteogenic cells more than GP and culture plates. TP/DNA of the cells on MWCNTs was significantly higher than on GP and the culture plates, which might suggested that MWCNTs induce the potential differentiation of cells more than GP and culture plates. In other words, cells cultured on the MWCNTs were more active. Moreover it was found that higher osteonectin, osteopontin, and osteocalcin gene express of the SaOS2 at 7 days on MWCNTs than on GP scaffolds, suggesting the MWCNTs scaffold could provide a better environment for the mineralization process and the osteoblastic maturation.

Some publications have shown that although with the same chemical composition, the materials had different effect on the cell differentiation. These materials, with specific structures, indicating larger surface area and therefore higher ability to adsorb proteins, have shown to

induce cell differentiation. The work of Ripamonti U and co-workers demonstrated that bone formation in hydroxyapatite was linked to the precise shape of surface concavities in implants, which indicated a larger surface area, and that using immunolocalization, they demonstrated that the bone formation occurred as a result of a concentration of specific proteins within the surface concavities.

Why did the MWCNTs scaffolds induce the maturation of the SaOS2 cells in this study? Since the MWCNTs scaffolds had much bigger ability to adsorb protein (Fig. 2), we hypothesized that the large amount of proteins adsorbed on the MWCNTs played an important role in inducing cellular functions.

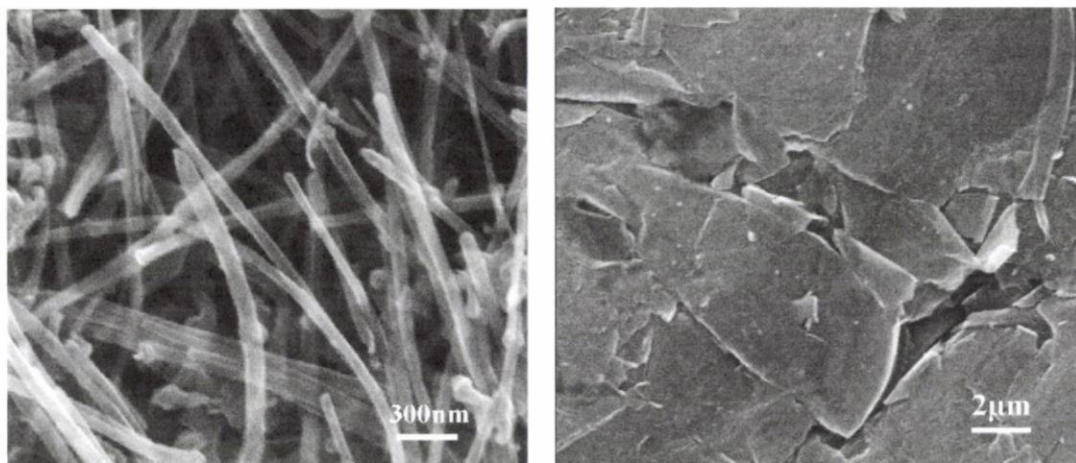
To confirm this hypothesis, we immersed the samples in culture medium containing rhBMP-2 to make them adsorb more proteins before cell culture. The results showed that after the adsorption of the rhBMP-2, both the TP/DNA and ALP/DNA increased on all samples. Impressively, the value for MWCNTs increased significantly most. The increments of the total-protein/DNA and ALP/DNA for MWCNTs was respectively as about 11 times and 18 times as the increments of those for GP and the control at both day 4 and day 7. Therefore, the results of cell culture after the adsorption of rhBMP-2 might be an effective proof for our hypothesis.

Hing has reported that competitive protein adsorption at a bioactive surface may vary in three ways, which is the quantity of protein adsorbed, the species of protein adsorbed and the confirmation of the adsorbed protein. Also he supposed that nanostructures might thus influence protein adsorption by providing a larger surface area, thereby increasing the quantity of adsorbed growth factors above a critical level for cell recruitment and activation. In our study, we substantiated the importance of the protein adsorption. Carbon nanotubes might adsorb large amount of proteins due to their larger surface area, unique electronic, catalytic and chemical properties. These proteins might be helpful for the cell differentiation and maturation of the osteoblasts and therefore directly contribute to bone tissue repair. Since *in vivo* cellular microenvironments are immobilized within tissue, and consist of diverse extracellular matrix (ECM) proteins, CNTs might induce

cellular functions *in vivo* by adsorbing large amount of proteins.

E. 結論

Carbon nanotubes might induce the osteoblastic differentiation and osteogenic maturation of the cultured human osteoblast-like cells (SaOS2) by adsorbing large amount of proteins, which indicated that the carbon nanotubes might be a candidate for scaffold material for bone tissue engineering.



(a) (b)
 Fig. 1. SEM of the compacts: MWCNTs (a); GP (b)

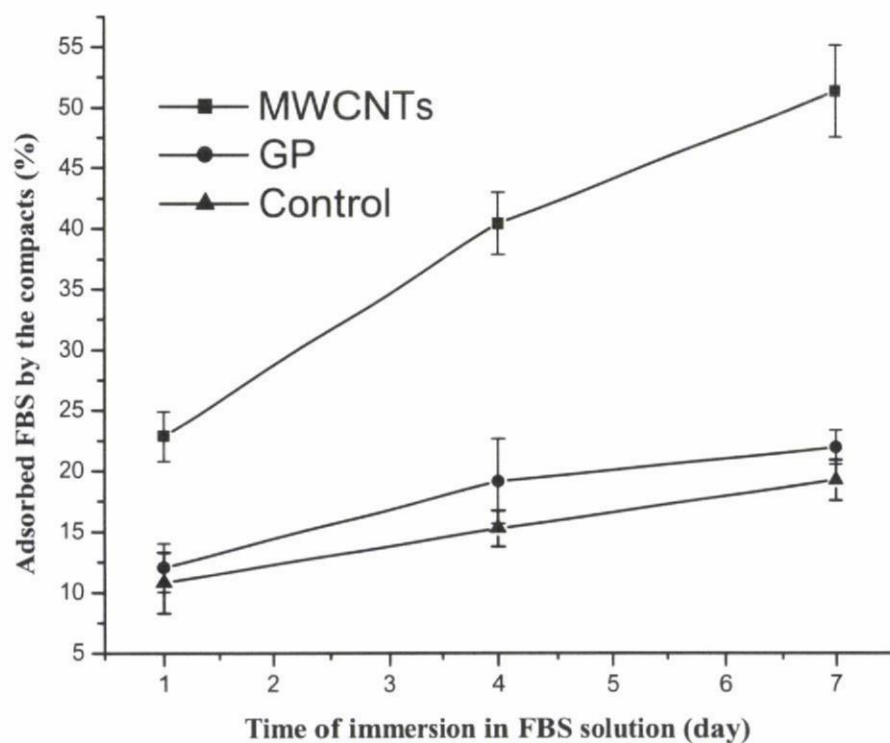


Fig. 2. Ability to adsorb proteins of the samples (n=5)

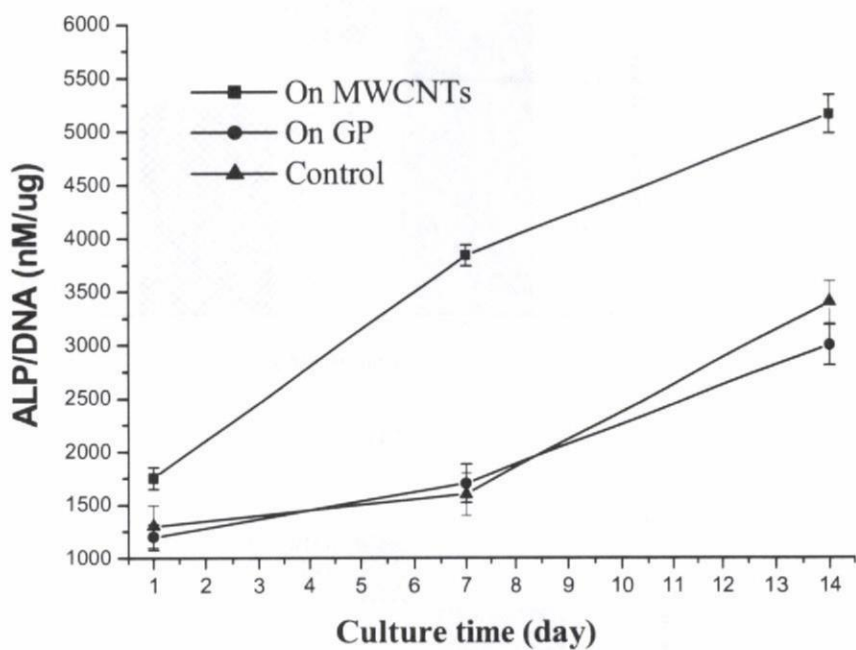


Fig. 3. ALP/DNA of the SaoS2 cells conventionally cultured on samples (n=4)

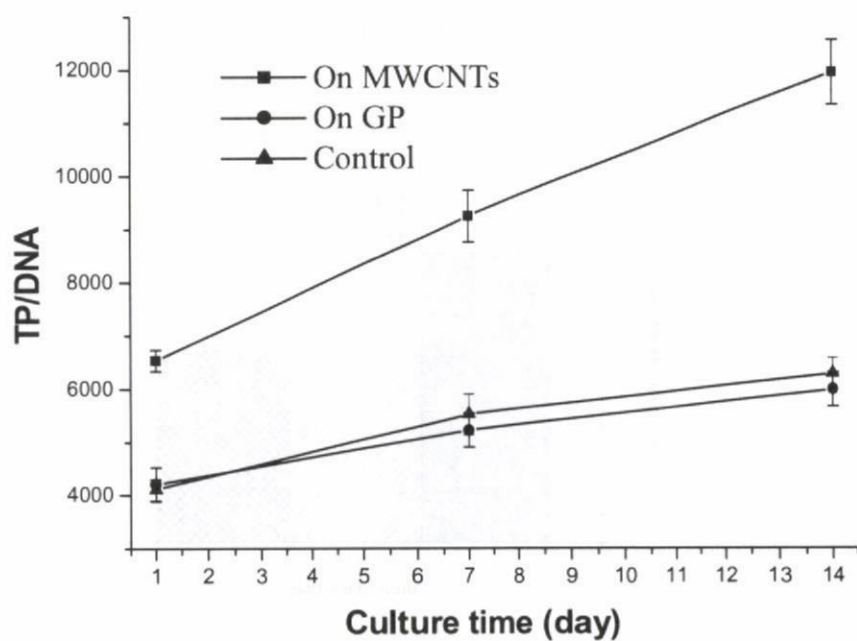
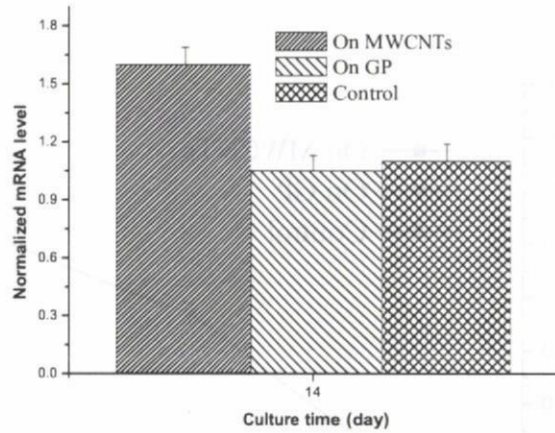
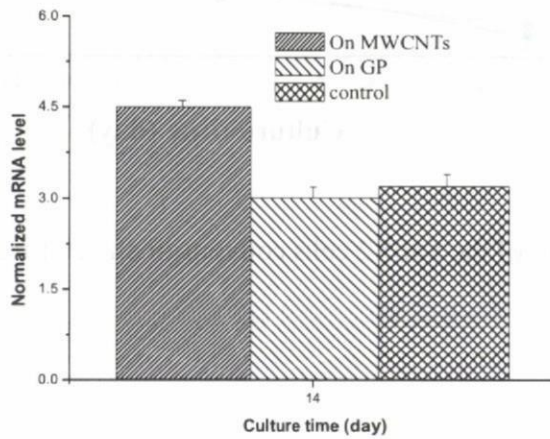


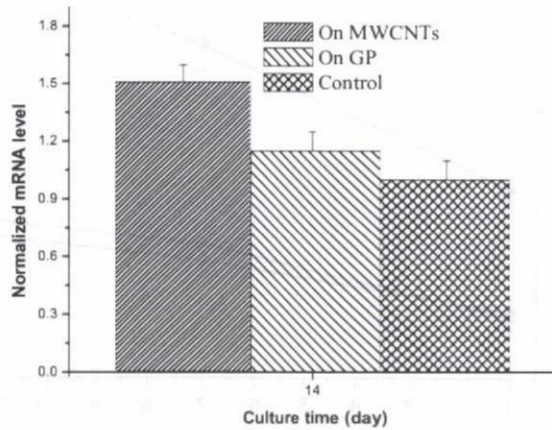
Fig. 4. Protein/DNA of the SaoS2 cells conventionally cultured on samples (n=4)



(a)



(b)



(c)

Fig. 5 Gene expression of (a) osteonectin, (b) osteocalcin, and (c) osteopontin normalized by the gene expression of 18S of cells conventionally cultured on the different samples (n=4).

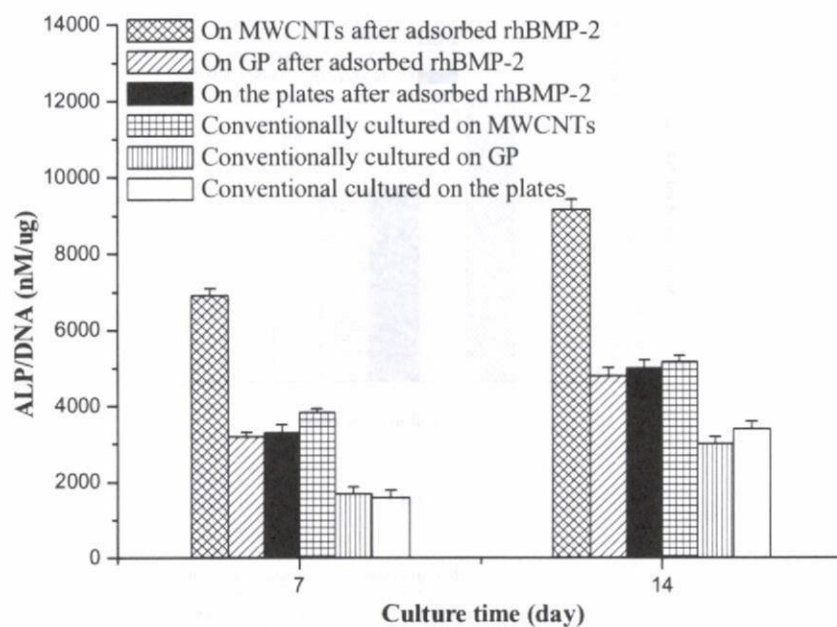


Fig. 6. ALP/DNA of the SaoS2 cells cultured on samples with and without the adsorption of rhBMP-2 in advance (n=4)

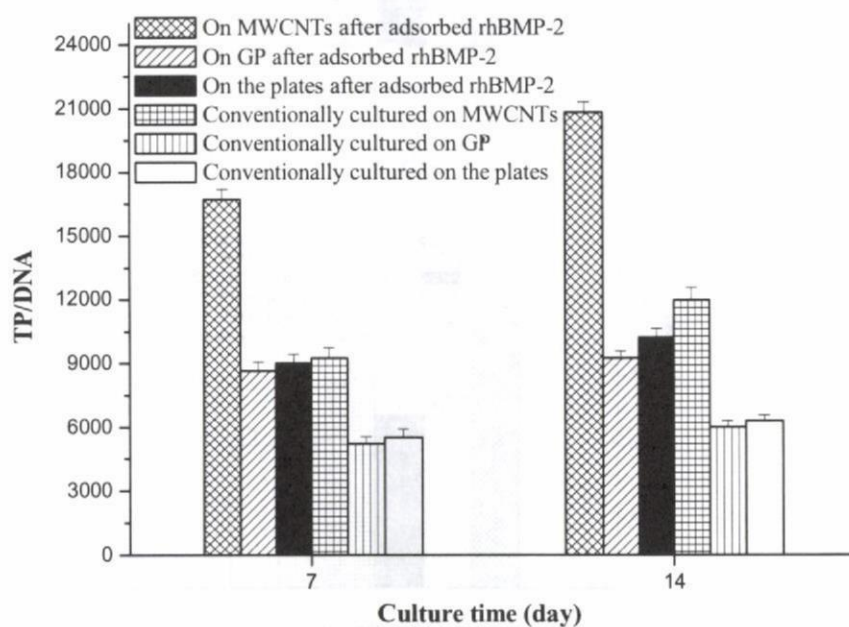
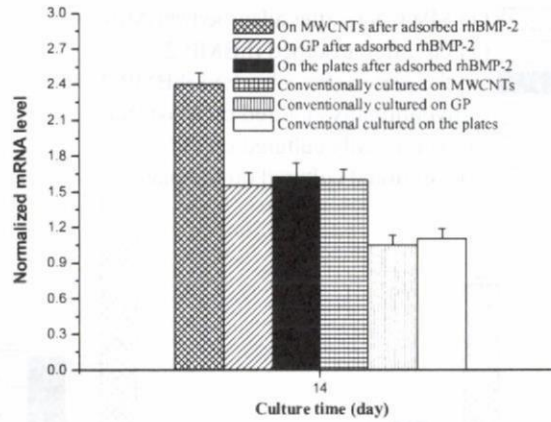
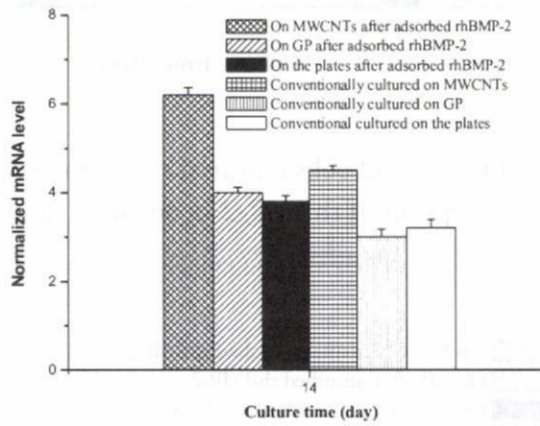


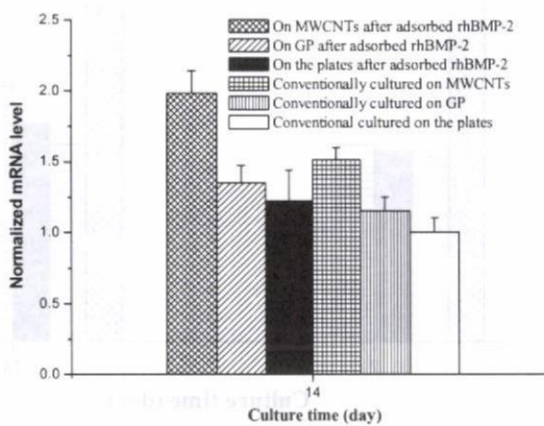
Fig. 7. Total-protein/DNA of the SaoS2 cells cultured on samples with and without the adsorption of rhBMP-2 in advance (n=4)



(a)



(b)



(c)

Fig. 8. Gene expression of (a) osteonectin, (b) osteocalcin, and (c) osteopontin normalized by the gene expression of 18S of cells cultured on the different samples with and without the adsorption of rhBMP-2 in advance (n=4).

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

正常および癌肝細胞培養における CNT 添加の影響

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 八若保孝 北海道大学歯学研究科教授
研究協力者 伊藤佐智子 北海道大学大学院歯学研究科大学院生

研究要旨 本研究においては、CNT が各細胞へ及ぼす影響を調べるため、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。それぞれの細胞を 37℃、5%CO₂ 環境下にて一定期間の培養を行った後、CNT を添加し、さらに培養した後に位相差顕微鏡、走査型電子顕微鏡（SEM）、透過型電子顕微鏡（TEM）にて細胞を観察した。添加する CNT はあらかじめ硝酸にて酸化処理を行ったものを用いた。CNT 無添加群と比較して CNT 添加群では SEM 像、TEM 像より細胞表面に突起がみられ、無添加群の細胞辺縁が丸みを帯びているのに対し、添加群では細胞辺縁が非常に入り組んでいる鋸歯状である様子が観察された。また、添加された CNT は細胞質内にて観察され、細胞質内で凝集していた。細胞核内での CNT は観察されなかった。

A. 研究目的

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。

培養環境 : 37℃、5%CO₂ 環境下にて 7 日間培養後、CNT を添加し、さらに 2 日間培養した後位相差顕微鏡にて細胞を観察した。

2) ALP 活性の測定

HC 細胞と HepG2 細胞をそれぞれ CNT を培養液中に添加したものと無添加の培養液にて 7 日間培養し、それぞれの ALP 活性について比較を行った。

B. 研究方法

1) MWCNT の添加による細胞への影響

CNT はあらかじめ硝酸にて酸化処理を行ったものを用いた。また、細胞用培地添加前に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。

C. 研究結果

CNT を培養液添加 2 日後、正常細胞 HC 細胞、癌細胞 HepG2 細胞ともに位相差顕微鏡にて細胞核を取り囲むように CNT が細胞内に取り込まれている様子がみとめられた (Fig.1)。走査型電子顕微鏡像では CNT を添加した細胞群において CNT 無添加群に比べ細胞表面に多数の突起がみとめられた。Fig.2 で示した透過型電子顕微鏡像では細胞表面に付着している CNT と細胞質内に取り込まれている CNT がみとめられ、細胞質内では CNT が全体に分散しているのではなく、局在している様子が観察された。

また、癌細胞では無添加群と添加群間での大きな形態差はみとめられなかったが、正常細胞では無添加群の細胞辺縁が丸みを帯びているのに対し、添加群では細胞辺縁が非常に入り組んでいる様子が観察された。

細胞の ALP 活性測定では、CNT 添加群と無添加群で大きな差はみとめられなかった。

D. 考察

CNT 添加によって正常肝細胞および癌肝細胞の ALP 活性には CNT 無添加群との差がみられなかったことから、CNT を添加することによる細胞機能低下の可能性は低いことが示唆された。しかし、TEM 観察より、CNT を細胞質内にもつ細胞では形態の辺縁が無添加群と異なっていることから、CNT が細胞形態へ影響をおよぼすことが示唆された。添加直後から CNT は細胞に付着している様子がみられ、TEM 観察よりその一部は細胞質内に入り込んでいる様子が観察されたが、CNT は細胞質内で凝集局在しており、細胞核内にはみとめられなかった。CNT の細胞質内への侵入過程は今後の研究課題である。

E. 結論

今回の結果より、CNT の細胞質内への侵入がみとめられ、CNT が細胞形態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. 伊藤佐智子、八若保孝、赤坂司、亘理文夫、ナノ微粒子体内動態可視化法の開発研究会 2008
2. 伊藤佐智子、八若保孝、赤坂司、亘理文夫、歯科理工学会秋季大会 2008

G. 知的所有権の取得状況

なし

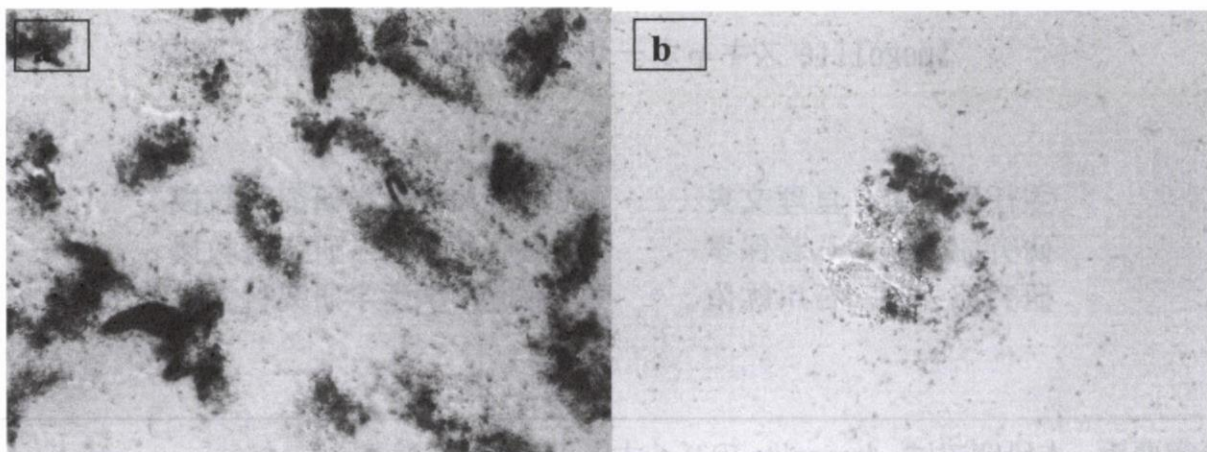


Fig.1 : CNT 添加後培養 2 日後の位相差顕微鏡像

a:正常細胞

b:癌細胞像

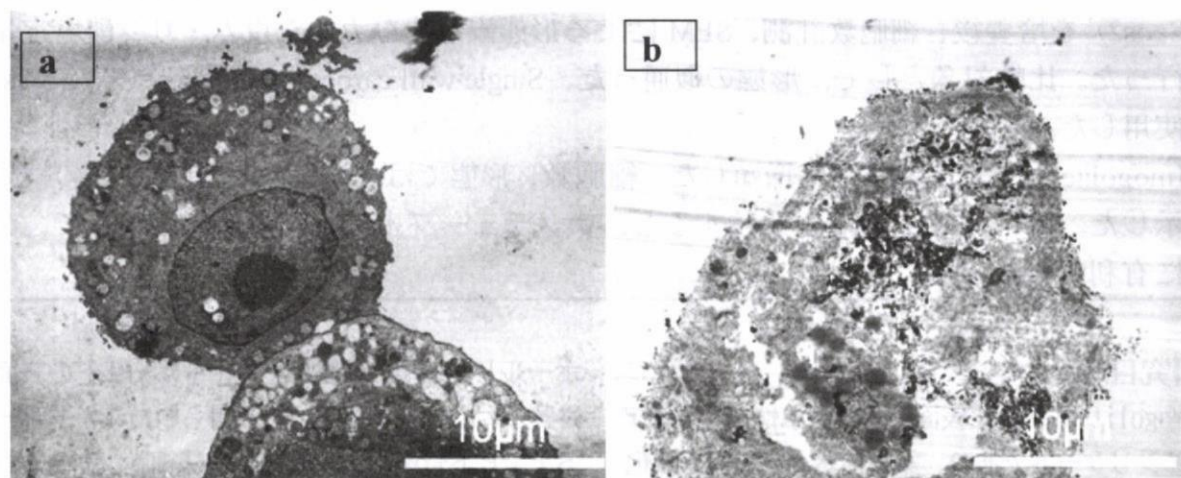


Fig.2 : 正常肝細胞の透過型電子顕微鏡像

a : CNT 無添加群

b : CNT 添加群

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

Imogolite スキャホールドが細胞機能へ与える影響

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	八若保孝	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	石川紘佑	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 本研究では、Imogolite のバイオ応用を検討した。

Imogolite は、自己組織化能を有する粘土鉱物の1つであり、およそ外径 2nm、内径 1nm、長さ数 μm の白色ナノチューブである。

今研究では、Imogolite 分散液を作製し、Imogolite を cell culture dish 上に直接コートしスキャホールドとした。作製したスキャホールド上で 14 日間、骨芽細胞様細胞 (Saos2) を培養後、細胞数計測、SEM による形態観察及びカルシウム・リン酸塩定量を行った。比較対象として、形態の似通った、Single wall carbon nano tubes (SWCNTs) を使用した。

Imogolite 上で細胞は良好に増殖した。細胞数、形態では SWCNTs とほぼ同様の結果を示した。cell culture dish と比較すると、ナノチューブ上の細胞は形態が多様で、分化に有利であると考えられた。

A. 研究目的

Imogolite は高い比表面積及び保水性を有するアルミノシリケートであり、柔軟性および自己組織化能を持った直径約 2nm の白色ナノチューブである。本研究では、Imogolite 及び SWCNTs を cell culture dish 上にコートし、スキャホールドとした。さらに、作製したスキャホールド上で細胞培養を行い、細胞成長に対するスキャホールドの影響を検討した。

B. 研究方法

Imogolite は、天然産出量が極わずかであり、鉄を主とした不純物を含むため、今研究では合成物（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）を使用した。SWCNTs は、名城ナノカーボン社製 FH-P を使用した。

まず、1000ppm Imogolite 及び 5ppm SWCNTs 分散液を作製し、cell culture dish 上にコートしスキャ

ホールドとした。作製したスキャホールドの表面粗さ及び、ぬれ性を測定した。得られたスキャホールド上でヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) を所定期間培養し、固定、乾燥の後、細胞数計測、SEM にて細胞形態観察及びカルシウム・リン酸塩定量を行った。

さらに、蛍光ラベルされたアルブミンを用い、蛋白質吸着試験及び、9000ppm NaF 溶液を用い、フッ素イオン吸着試験も行った。イオン計測にはフッ素複合電極 (Thermo Orion) を使用した。

C. 研究結果

スキャホールド上にて、14日間ヒト骨芽細胞様細胞の培養を行ったところ、強い細胞接着および伸展形態が観察された。

また、コントロールである cell culture dish と比較したところ、ほぼ同等な良好な細胞増殖が認められた。

一方で、Imogolite及びSWCNTs上では細胞表面に多くの生成物が観察される傾向があり、分化に有利である可能性も考えられた。

カルシウム・リン酸塩定量においては、ポリスチレンディッシュと比較し、Imogolite上の細胞においては形成カルシウム量の増加傾向が認められた。

また、ImogoliteはCNTsと同様に高いタンパク質吸着能があり、細胞の初期接着に有効と考えられる。

イオン吸着試験では、SWCNTsがほとんど吸着しなかったのに対し、Imogoliteは、フッ素イオンを、多量に吸着した（自重のおよそ75%）。この性質は、Imogoliteをフッ素にて修飾し、歯科充填材料に導入するなど種々の用途に応用可能と考えられる。

2. 実用新案取得
無し



D. 考察

Imogolite スキャホールド上の多様な細胞形態及び、生成物、形成カルシウム・リン酸塩量より分化に有利であることが推測される。しかし、今研究での、SWCNTs との比較から、**Imogolite** のどの要素が細胞培養に有利に働いたのか解明できなかった。今後、ALP 活性等種々の生化学的アッセイを行い、その有効性を検討してゆく必要があると考えられた。

E. 結論

Imogolite は細胞培養に、有効な材料であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1. 石川紘佑, 赤坂 司, 八若保孝, 巨理文夫 “ケイ酸塩無機ナノチューブ (イモゴライト) 上での細胞培養”, 第52回日本歯科理工学会、大阪、豊中市 2008

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し



図1 Imogolite TEM 像(×50000)

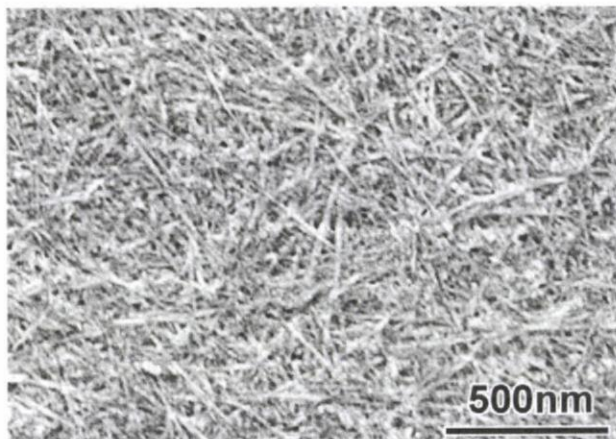


図2 Imogolite スキャホールド SEM 像

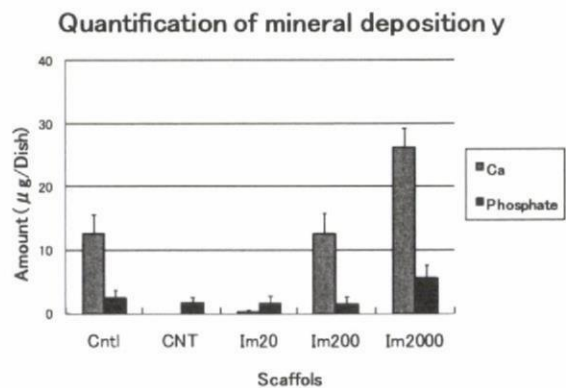


図3

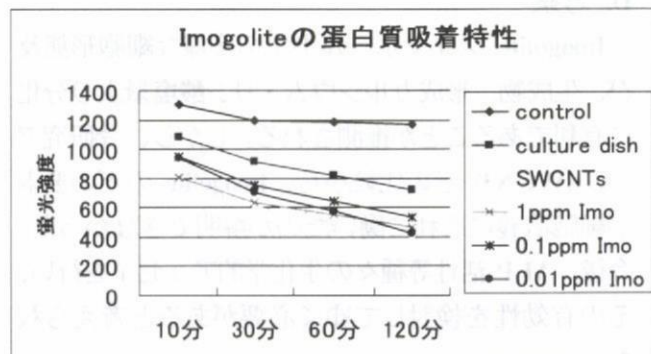


図4

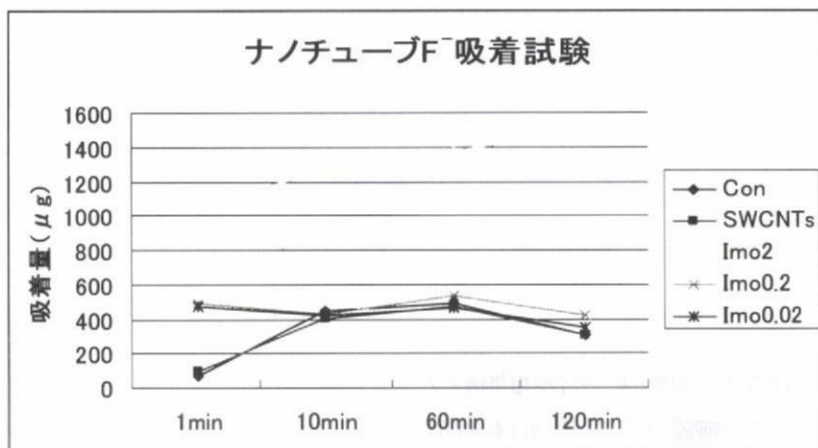


図5

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

生体と無機ナノ粒子のかかわりと応用に関する研究

主任研究者 巨理文夫 北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者 米澤 徹 東京大学大学院理学系研究科 准教授

研究要旨 本研究においては、生体と無機ナノ粒子のかかわりとその応用について検証することを目標にした。ナノ粒子の形状異方性について検証を行うため、自ら金属ナノ粒子の合成を行った。無機ナノ粒子と生体のかかわりについては、その粒子の材質、表面に吸着している分子、大きさ、形状、表面電位など、様々なファクターが関与することが考えられる。本年度は、生体関連物質の質量分析を行い、将来のマスマッピングに寄与すべく、ナノ粒子を用いた表面支援レーザー脱離イオン化法の検証を行った。上記で見出した異方性ナノ粒子が生体関連物質のイオン化に非常に良好であることが見出された。そのとき、良好な質量分析のために、金属表面を保護剤などの有機分子でコートせずに安定に水中に分散させた金属ナノ粒子の調製について試験・検討を行った。

A. 研究目的

これまでも粉体の材料化は世の中の大きな興味であった。粉末冶金技術も世の中で多用されてきている。さらに、近年、ナノ材料に対する関心が近年高まってきており、金属や半導体のみならず、有機物・無機物、様々な物質のナノ化が行われてきた。ナノ物質は、バルク状態とも原子・分子状態とも異なる物性を示しうる材料として非常に期待される。こうしたナノ粒子は、そうした新物性と、高い比表面積とによって、触媒、色材、蛍光材料、バイオセンシング、抗菌作用、磁性材料、電子材料、電極材料、配線材料、担体、光学材料などに幅広い応用が期待されている。特に、化学法によって容易に合成できる金属や金属酸化物のナノ粒子に関する研究が膨大になっており、世の中の期待を背負っている。

このように材料化への期待が強いナノ粒子であるが、近年、その生体とのかかわりについての研究も目立ってきている。とはいえ、金ナノ粒子は電子顕微鏡の染色剤などに用いられてきたり、プラズモン吸収をもつ金や銀ナノ粒子がバイオセンサーとして

利用されてきている。例えば、妊娠検査薬やウィルスセンシングなどにすでに実用化されている。また、金属光沢をもった表面を形成するための色材としてアルミホイル表面への塗布などへも応用展開されている。さらに、白金族のナノ粒子はこれまで様々な化学反応のための触媒として利用されてきており、燃料電池触媒としても非常に興味を持たれている。また最近では、活性酸素除去能があることが示され、より生体とのかかわりの深い場面で使用され始めている。また、異方性をもたせることが容易であって、棒状、花弁状の白金ナノ粒子などが構築可能である。

一方、金属酸化物のナノ粒子は、よく形状・粒径の揃ったシリカの集積体がフォトニック結晶として興味を持たれているほか、化粧品用途はもちろんのこと、チタニアは、光触媒や白色顔料として多用されている。また、マグネタイトやFePtなどの磁性粒子は、ハイパーサーミアなどの磁気医療分野や、垂直時期記録方式の記憶メディアなどへの展開も図られている。

本研究では、生体とのかかわりを中心に検討を重

ねてきたが、新しく、質量分析へナノ粒子の応用展開を試みることにした。生体関連物質の質量分析のためのイオン化を行うために、高分子量領域の分析が得意なレーザー脱離イオン化 (LDI) 法を用いることにした。一般に、LDI はハードイオン化であるため、レーザー光を吸収し、脱離・イオン化を促進するフェニル環をもった、マトリクス分子を添加する。これをマトリクス支援 LDI (MALDI) 法といい、ソフトイオン化法の代表例のひとつである。(ソフトイオン化とは分子を分解しないでイオン化する方法) しかしながら、MALDI 法では、マトリクス分子の添加が必須であることや、マトリクス分子と試料分子が共晶をつくり、その周囲において脱離・イオン化が大きく促進されることから、「スイートスポット現象」(感度の高い点と低い点があり、均一にイオン化することができない) が見られる。また、MALDI 法は、試料にとってはソフトイオン化法であるが、マトリクス分子にとってはハードなイオン化法であって、マトリクス分子が分解し、様々な雑ピークを呈してしまう欠点がある。そこで、脱離・イオン化を促進するシステムとして、表面支援 LDI 法 (SALDI 法) がある。

最近、この SALDI 法のためのサンプル基板として、ナノ粒子を塗布した基板が用いられてきている。特に、微細な凹凸をもたせた基板が脱離・イオン化に有効であるので、本研究では、異方性の粒子を用いて SALDI 法を行うことを試みた。その結果について本報告で述べる。

B. 研究方法

いくつかの金属ナノ粒子を SALDI-MS 基板としてこれまで応用してきた。まずは、金属の特性をみるために、保護剤をもたせずに安定に分散させることができるレーザーアビュレーション法によるナノ粒子の合成を使い、SALDI-MS 用サンプル基板を作製した。

作製した金属ナノ粒子は、金、銀、銅、白金である。得られた結果として、金と白金のみが、良好な SALDI-MS 特性を示し、銅、銀は不適であった。酸化銅は SALDI-MS 特性を有していたことから、この結果は、金属の熱伝導性によるものであろうと考えられる。白金は他の金属に比べ熱伝導率が極めて低いため、レーザーが当たった後、その表面が急速

に昇温し、脱離・イオン化が促進されると理解される。一方で、銅は熱伝導率が高く、酸化銅は低いいため、このような結果になったものと思われる。

そこで、さらに白金ナノ粒子に異方性を持たしたものを作製した。

作成法は、塩化白金酸を穏やかな還元剤であるギ酸を用いて、混合・放置によって還元した (*Adv. Mater.*, 2008)。得られたナノ粒子分散液をメンブレンフィルターでろ過し、十分に精製水で洗浄して、表面のコンタミネーションを十分除去した。

質量分析器は、島津/KRATOS 製 AXIMA-CFR を用いた。UV パルスレーザーを照射し、サンプルを脱離・イオン化する。サンプルはステンレス製サンプルプレート上に、SALDI 用無機ナノ粒子分散液を塗布し、イオン化促進剤としてクエン酸を添加、サンプルを滴下して乾燥して、観察を行った。

白金は活性であるため、有機溶媒をもちいることは難しいことは注意点である。

CD. 研究結果と考察

得られた白金ナノ構造体の SEM 写真を Fig.2 に示す。フィラー状の白金ナノ構造体が得られており、白金の高結晶性が生かされた材料ができあがっている。その太さや長さはほぼ一定であることが見て取れる。こうしたナノ粒子は、イオン液を常温で静置することによって可能であって、攪拌したり加熱した場合には、球状粒子ができてしまう。このようにして得られた白金ナノ構造体を水に分散させて利用した。アルコールなどに分散する場合には、白金の活性が高いと発火する場合もあるので注意が必要である。

得られた質量スペクトルの例を Fig. 3, 4 に示した。対象の生体関連物質として、ペプチド/タンパク質のアンジオテンシン I、サブスタンス P、ヒトインスリン、トリプシノーゲンなどを観察を行った。いずれも良好な脱離・イオン化が起こることが示された。低分子量領域にもあまり目立った不純物ピークが見られず、クエン酸の添加によって、イオン化も促進され、アルカリ金属イオンのピークも減少した。

また、スイートスポット現象も有機マトリクスを用いた場合よりも小さい場合が多いことがわかった。このように、異方性構造を持つ白金を用いた SALDI は効率がよいことが示された。

また、このように MALDI に比べ利点の多い SALDI-MS 法であるが、欠点もある。SALDI 法はこれまで高分子のイオン化に適していないとされてきた。というのも、折角ナノレベルで凹凸を基板上に作ったとしても、高分子であると多点で表面に吸着するので脱着が難しいという点である。しかしながら、本研究で得られた白金ナノ構造体では、Fig. 4 の通り、トリプシノーゲンも良好にイオン化できることがわかった。

E. 結論

細い白金ナノ構造体を作製することによって、効率よく生体関連物質のイオン化が可能となった。また、高分子量の物質のイオン化にも対応可能となり、今後、タンパク質などの高効率イオン化への応用が強く期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Terasaki,* N. Yamamoto, T. Hiraga,* Y. Yamanoi, **T. Yonezawa**, H. Nishihara,* T. Ohmori, M. Sakai, M. Fujii,* A. Tohri, M. Iwai, Y. Inoue, S. Yoneyama, M. Minakata, and I. Enami, “Plugging a Molecular Wire into Photosystem I for Reconstitution of the Photoelectric Conversion System on a Gold Electrode”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press (2009).
2. **T. Yonezawa**,* H. Kawasaki, A. Tarui, T. Watanabe, R. Arakawa, T. Shimada, and F. Mafuné, “Detailed Investigation on Possibility of Nanoparticles of Various Metal Elements for Surface-Assisted Laser Desorption/ Ionization Mass Spectrometry”, *Anal. Sci.*, in press (2009).
3. I. Nakamura, Y. Yamanoi, **T. Yonezawa**, T. Imaoka, K. Yamamoto, and H. Nishihara*, “Nanocage Catalyst – Rhodium Nanoclusters Encapsulated with Dendrimers as Accessible and Stable Catalysts for Olefin and Nitroarene Hydrogenations”, *Chem. Commun.*, **2008(44)**, 5716-5718.
4. **T. Yonezawa**, K. Uchida, Y. Yamanoi, S. Horinouchi, N. Terasaki, and H. Nishihara*, “Room-Temperature Immobilization of Gold Nanoparticles on Si(111) Surface and Their Electron Behaviour”, *Phys Chem Chem Phys*, **10(46)**, 6925-6927 (2008).
5. M. Miyachi, Y. Yamanoi, **T. Yonezawa**, H. Nishihara, M. Iwai, M. Konno, M. Iwai and Y. Inoue, “Surface immobilization of PSI using vitamin K₁-like molecular wires for fabrication of a bio-photoelectrode”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 1714-1718 (2008).
6. M. Nakai, Y. Yamanoi, Y. Nishimori, **T. Yonezawa**, H. Nishihara*, “Observation of Electrochemical Single Electron Transfer Events of Au Nanoparticles in Aqueous Solutions in the Presence of Both Amine and Sulfonate Surface-active Agents”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47(35)**, 6699-6702 (2008).
7. A. Tarui, H. Kawasaki, T. Taiko, T. Watanabe, **T. Yonezawa**, and R. Arakawa, “Aggregated gold-nanoparticle-supported silicon plate with cationic diblock copolymer micelles for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, in press.
8. H. Kawasaki, T. Sugitani, T. Watanabe, **T. Yonezawa**, H. Moriwaki, R. Arakawa, “Layer-by-layer Self-Assembled Multilayer Films of Gold Nanoparticles for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry”, *Anal. Chem.*, **80(19)**, 7524-7533 (2008).
9. M. Tomonari, K. Ida, H. Matsushita, and **T. Yonezawa**, “Size-Controlled Oxidation Resistant Copper Fine Particles Covered by Biopolymer Nanoskin”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **8(5)**, 2468-2471 (2008).
10. T. Watanabe, H. Kawasaki, **T. Yonezawa**, and R. Arakawa, “Surface-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) of Low Molecular Weight Organic Compounds and Synthetic Polymers Using Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles”, *J. Mass Spectrom.*, **43**, 1063-1071 (2008).
11. N. Shirahata, **T. Yonezawa**, Y. Matsushita, Y. Masuda, K. Koumoto, “Fusion and Growth Behavior of Gold Nanoparticles Stabilized by Allylmercaptane”, *Macromol. Symp.*, **270**, 82-87 (2008).
12. **米澤 徹**, 「金ナノ粒子の調製」、春田正毅監修 「金ナノテクノロジー:その基礎と応用」(仮題)、

- シーエムシー出版、東京 (印刷中)
13. **米澤 徹**、「微粒子の生体影響」、「ハイブリッド微粒子」、「現代界面コロイド化学の基礎」内、「第4章 微粒子 — 第4節 微粒子の特殊な機能と性状」、日本化学会編、丸善、東京 (印刷中)
 14. **米澤 徹**、「金属ナノ粒子の湿式合成とその応用」、ケミカルエンジニアリング、**53(8)**, 583-587
- ## 2. 学会発表
1. 劉 洋, 八井 崇, **米澤 徹**, 大津元一、「量子ドット列を用いた近接場光伝送路の開発」、MesoMolSys 研究会 (東京) 第1回・夏季セミナー2008 (2008.9.5)
 2. 川崎 英也, 杉谷 剛, 渡辺 健宏, **米澤 徹**, 荒川 隆一、「表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (SALDI-MS) のため金ナノ粒子/高分子交互吸着シリコン基板」、第61回コロイドおよび界面化学討論会 (福岡・九州大学 六本松) 1F11 (2008.9.7)
 3. **米澤 徹**, 荒井重勇, 竹内宏典, 上野武夫, 黒田光太郎、「銀ナノ粒子の調製と高温その場観察」、第61回コロイドおよび界面化学討論会 (福岡・九州大学 六本松) 2C05 (2008.9.8)
 4. **米澤 徹**, 竹岡伸介, 岸弘志, 井田清信, 友成雅則、「銅粒子を内部電極材料とした MLCC の作成」、MES (Micro-Electronics Symposium) 2008 (京都・京都大学) 1C13 (2008.9.18)
 5. **米澤 徹** (依頼発表)、「高分子が制御する無機ナノ粒子の構造・機能」、第57回高分子討論会 (大阪・大阪市立大学) 2E14 (2008.9.25)
 6. H. Nakatani, K. Miyazaki, H. Shibata, **T. Yonezawa**, H. Takeda, Y. Azuma, S. Watanabe, Studies on local degradation behavior of polypropylene/talc composite, 7th International Symposium on Weatherability (ISW) (横浜・関東学院大学) (2008.10.12)
 7. **米澤 徹**、「ナノ構造の新しい作製技術とその応用」、第16回ナノフォトンクスオープンセミナー (東京大学) (2008.11.6)
 8. 中谷久之, 柴田 洋, **米澤 徹**, 竹田英俊, 東 泰, 渡辺 真、「鉄系不純物がポリプロピレン/タルク複合材料の劣化挙動に与える影響」、2008年度高分子の崩壊と安定化研究討論会 (東京・キャンパスイノベーションセンター) (2008.12.18)
 9. 浅野貴志, **米澤 徹**, 藤野竜也, 西原 寛、「包接マトリックスによる低分子薬物の質量分析」、日本化学会第89春季年会 1G6-34 (2009).
 10. **米澤 徹**, 荒井重勇, 竹内宏典, 上野武夫, 黒田光太郎、「表面が清浄な銀ナノ粒子の調製と高温その場観察」、日本化学会第89春季年会、2L3-03 (2009).
 11. **米澤 徹**, 河合功治, 西原 寛、「新規リガンドを用いた水分散性金コロイド」、日本化学会第89春季年会、2L3-13 (2009).
 12. **米澤 徹**、「自己組織的なナノ粒子の制御固定 ~DNA などを利用して~」春季 第56回応用物理学関係連合講演会 (筑波・筑波大学)、シンポジウム「ナノフォトにクスにおけるナノ加工の最前線と理論基盤」(2009.3.30)

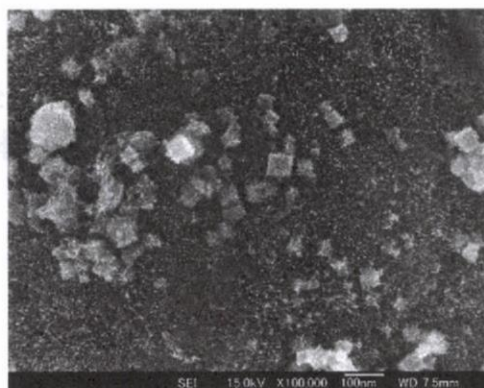
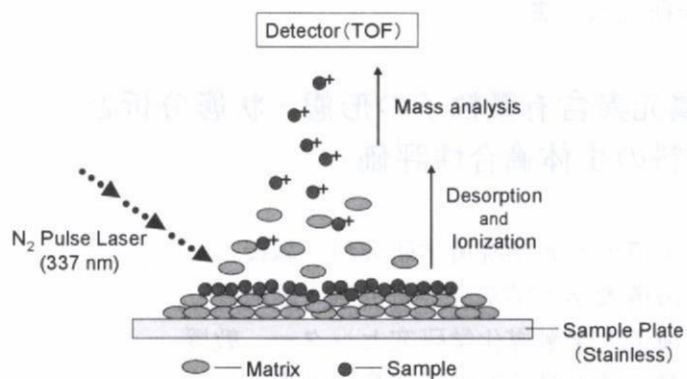


図 1

図 2

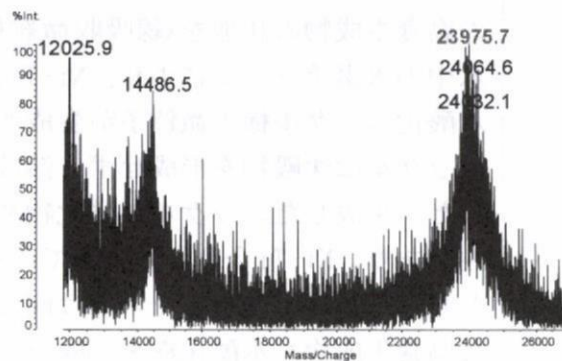
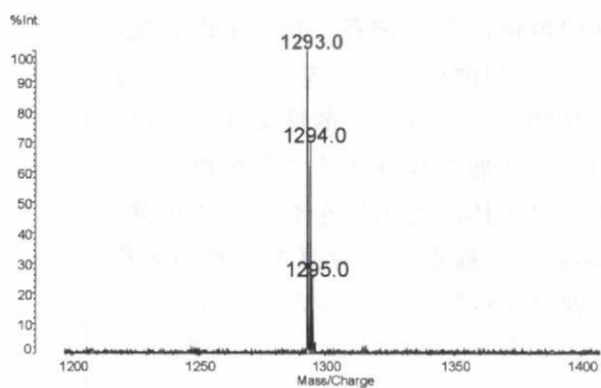


図 3

図 4

図 1 SALDI-TOF-MS の模式図

図 2 使用した白金ナノ構造体の SEM 写真

図 3 アンジオテンシン I の質量スペクトル

図 4 トリップシノーゲンの質量スペクトル