

Ni-Ti 合金腐食粉末により誘導されるアポトーシスがどのようなシグナル経路を介するかを、MC3T3-E1 細胞に Ni-Ti 合金腐食粉末を添加し 24 時間培養後、蛋白を回収しウエスタンブロットで検討した。その結果 cleave された caspase3, 8, 9 の腐食粉末添加による発現上昇が確認され、それにつづく PARP の cleave が確認された。しかし Bcl-xL, Bcl-2, FLIP, Mcl-1, XIAP といった抗アポトーシス因子の発現には変化が認められなかった。このことから、Ni-Ti 合金の腐食粉末による骨芽細胞に対するアポトーシス誘導には caspase3, 8, 9 が関与することが考えられ、デスレセプターを介する経路、ミトコンドリア経路の双方が関与するものと予測される。しかしながら、これらの因子を調節するシグナル経路の上流の因子につきましては更なる検討が必要である。

一般に生体安全性が高いとされる Ni-Ti 合金も腐食により微粒子が生成され、マクロファージによる炎症の惹起と骨芽細胞のアポトーシスを誘導し骨破壊を助長しうるものと考えられた。

E. 結論

本研究により、骨代替材料では生体親和性の評価が材料開発の重要な指針となるが、循環器、消化器系のバイオマテリアルの開発では免疫学的立場からの材料評価が重要な指針であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Asaoka K, Maejima K. Hydrogen-related degradation of mechanical properties of titanium and titanium alloys. J ASTM Int. (in Press)
2. Hosoki M, Bando E, Asaoka K, Takeuchi H, Nishigawa K. Assessment of allergic hypersensitivity to dental materials. Biomed Mater Eng. (in press)
3. Tomita M, Yokoyama K, Asaoka K, Sakai J. Hydrogen thermal desorption behavior of Ni-Ti superelastic alloy subjected to tensile deformation after hydrogen charging. Mater Sci Eng A, 476: 308-315, 2008.

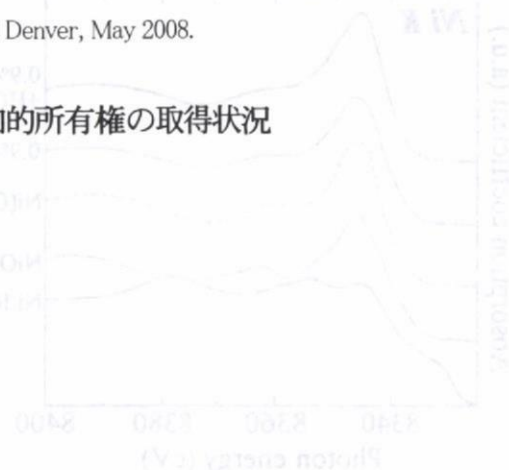
2. 学会発表

1. 日浅雅博, 浅岡憲三, "Ti 合金の腐食と免疫応答", 第22回歯科チタン学会, 東京, 2009

2. Hydrogen related degradation of mechanical properties of titanium and titanium alloys. Asaoka K. 2nd Symposium on fracture and fracture of medical metallic materials and devices, ASTM Denver, May 2008.

G. 知的所有権の取得状況

無し



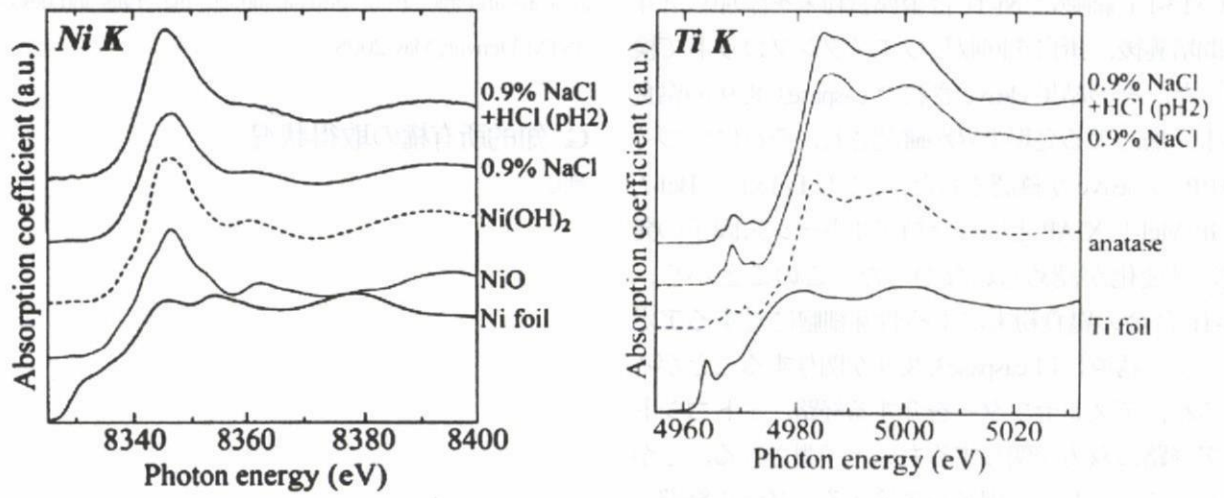


図1 Ni-Ti合金腐食生成物のXANESスペクトル

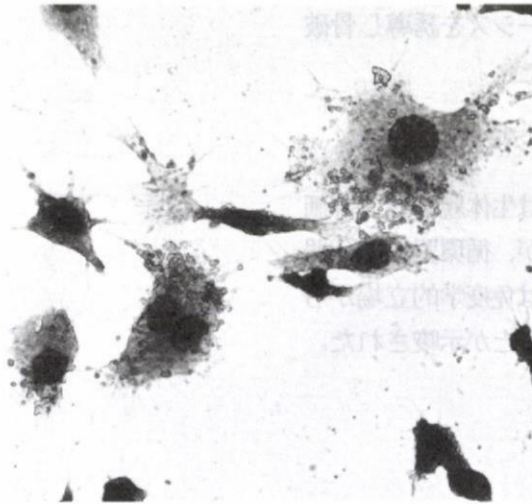


図2 Ni-Ti合金腐食粉末のマクロファージによる食食像

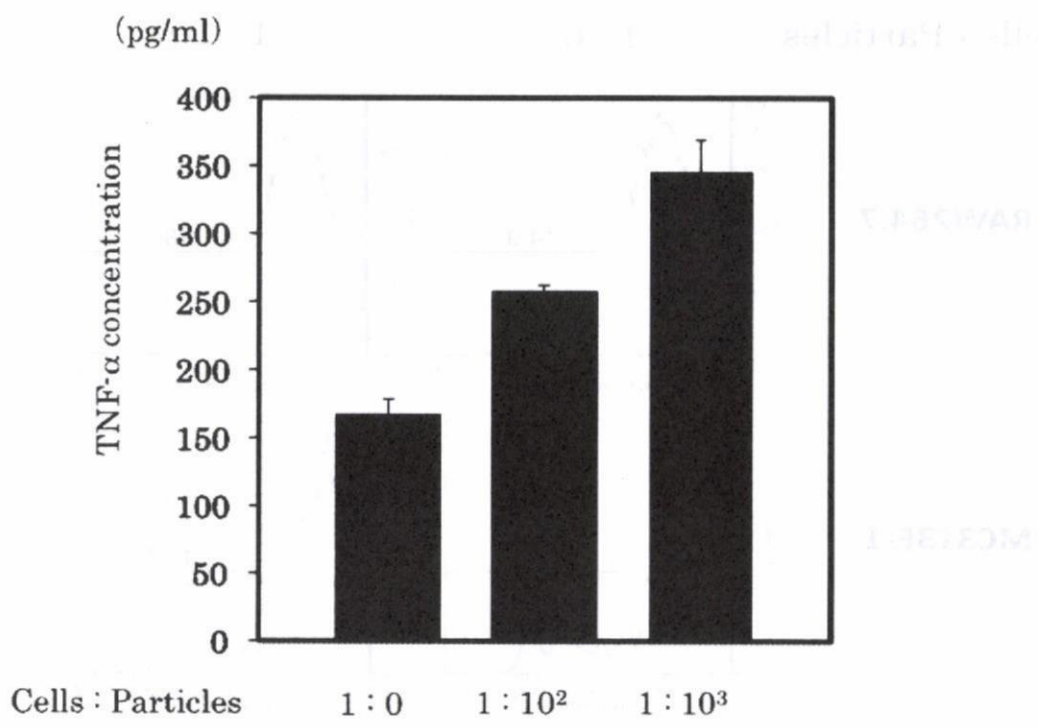


図3 Ni-Ti合金腐食粉末により誘導されるTNF- α の産生

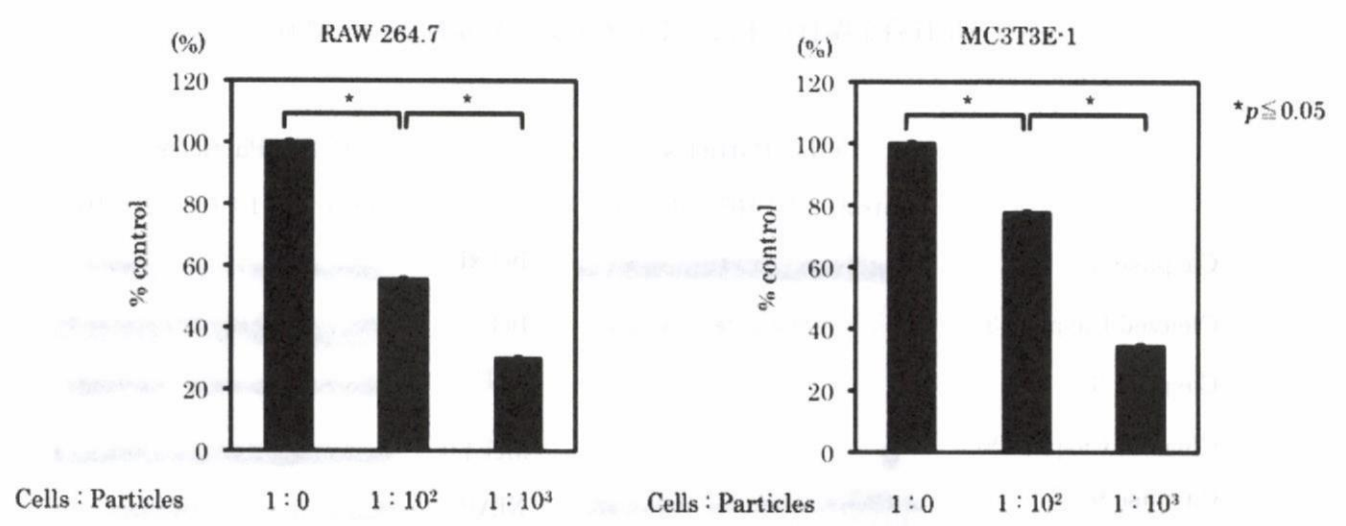


図4 Ni-Ti合金腐食粉末の細胞増殖に対する効果

Cells : Particles

1 : 0

1 : 10²

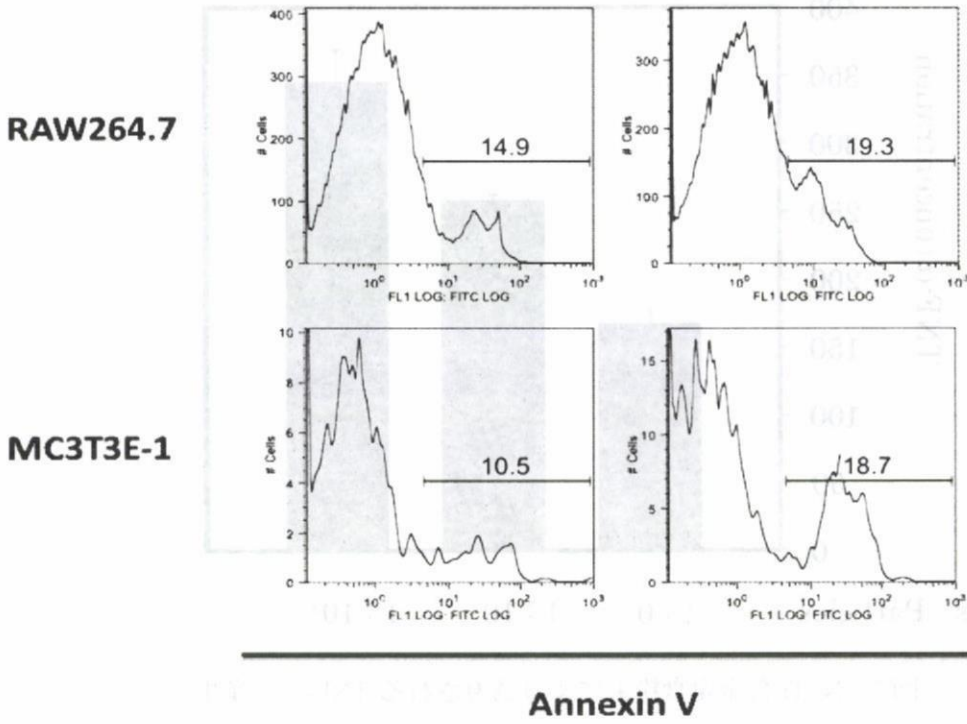


図5 Ni-Ti合金腐食粉末によるアネキシンV陽性細胞の増加

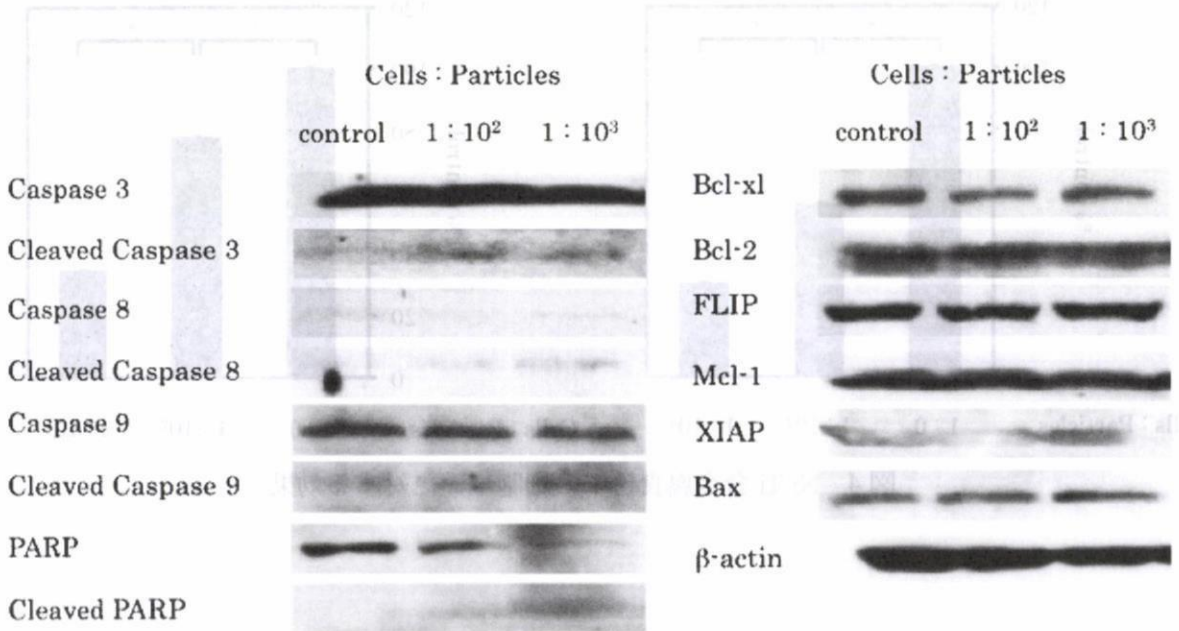


図6 Ni-Ti合金腐食粉末のアポトーシス関連蛋白の発現への影響

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

カーボンナノチューブによる芳香族揮発性有機化合物の吸着機構に関する研究

分担研究者 古月文志 北海道大学大学院地球環境科学院教授
研究協力者 曾根弘昭 北海道大学大学院地球環境科学院大学院生

研究要旨 CVD法で作成されたカーボンナノチューブを充填した吸着カートリッジを作製し、23種の揮発性有機化合物（VOCs）を含む気体をモデルサンプルとして用いて、吸着実験を行った。その結果、カーボンナノチューブは芳香族VOCsに対して高い選択性を示し、更に、この選択性はカーボンナノチューブの結晶度の増大と共に高くなることが分かった。芳香族VOCsに対する選択性の順番は、*p*-ジクロロベンゼン>*o*-キシレン>*m*-*p*-キシレン>トルエン>ベンゼンであり、この選択性についてフロンティア軌道理論を用いて考察した。フロンティア軌道の相互作用は、それぞれのLUMO及びHOMOのエネルギー準位の差が小さい組み合わせのほうが、より安定した反応中間体を形成する傾向があることが知られている。即ち、HOMOとLUMOのエネルギーが差の小さい芳香族VOCsのほうが、カーボンナノチューブから π 電子を受け取りやすくなり、その結果、優先的にカーボンナノチューブと結合し、吸着されることになることを説明することができる。この研究は、カーボンナノチューブの化学物質に対する親和性又は反応性について電子レベルで検討した研究であり、カーボンナノチューブの生体反応特性の研究に対しても寄与する。

A. 研究目的

揮発性有機化合物（volatile organic compounds: VOCs）は、環境管理の分野に対する主に4つの理由から、大きな注目を浴びている。第1に、VOCsは職域、商品など、様々な環境に存在している[1-4]。それゆえ人々は、呼吸や皮膚への接触によって、簡単にVOCsに暴露されている。第2に、VOCsは暴露した状態が続く事によって、主な症例は、直接的な健康被害（急性毒性）として、目や喉に対する刺激、もしくは二次的な健康被害（慢性毒性）として、肝障害や中枢神経が損傷を与えられる事が危惧されている[5, 6]。第3に、VOCsは、例えば二酸化窒素などの大気中の化学物質と反応することによって発生するオゾンやその有害な副産物によって、光化学スモッグを引き起こす原因になる[7]。第4に、VOCsは埋め立て地からの浸出水や工業排水からも発生する。これらが地下水に混入することによって深刻な環境汚染の原因となる[8]。

VOCsのなかでも芳香族化合物、特にベンゼン、

トルエン、キシレンそしてジクロロベンゼンに多大な注意が払われている。その理由は、多くの芳香族VOCsは発癌性物質であることが知られ、もしくは懸念されているためである[9]。そのうえ、これらの化合物を摂取することによって引き起こされる発癌効果に対する安全な閾値が非常に小さい。このように、例えば少量の暴露であったとしても、人体への危険をもたらす。実際に、ベンゼン、トルエンそしてキシレンはBTXと呼ばれ、VOCsの人体に対する暴露の指標として取り扱われている[10]。

近年、VOCsを除去するために、活性炭を吸着剤に用いた処理が行われている[11-13]。しかしながら、活性炭は吸着選択性を持たないため、共存するガスの組成によって吸着剤としての寿命が左右されるため、VOCsに対する吸着選択性が求められている。ここ10年程度で、VOCs除去のための新規炭素素材の開発と実用化の試みが注目されつつある。特に、カーボンナノチューブ（carbon nanotubes: CNTs）と呼ばれる炭素素材が、その特異的な性質によって期

待されている。CNTs は、炭素原子によって形成される筒状の層の形態を基準にして、多層カーボンナノチューブ (multi-walled carbon nanotubes: MWCNTs) と単層カーボンナノチューブ (single-walled carbon nanotubes: SWCNTs) に区別されている。MWCNTs は 30 年以上前に [14], SWCNTs は 15 年前に [15, 16] 発見された。CNTs の表面は、炭素原子が sp^2 結合の六員環で連なる円筒型グラフェンシートによって形成されているため、芳香族化合物の吸着に対する形態構造的に優位性を持つ。Long と Yang は、気体試料からのダイオキシン類除去のための吸着剤として、MWCNTs を用いた [17]。このとき、MWCNTs へ吸着されたジベンゾ-パラ-ジオキシンの脱離活性化エネルギーは 315 kJ/mol であり、非常に強く結合されていることを明らかにした。特にヘンリーの法則が適用される状態において、従来使われていた活性炭よりも CNTs の吸着容量が大きい事を発見した。Li らは、MWCNTs を水中 VOCs の固相抽出に用いる吸着剤として用いた [18]。MWCNTs は、卓越した抽出能力と高回収率を示した [18, 19]。これらの研究は、CNTs による汚染物質吸着能力の実験的な論拠をもたらした。それにもかかわらず、様々な種類の VOCs から芳香族 VOCs のみを分離するために、CNTs を吸着剤として適用するための可能性の検討はなされていなかった。

本研究は、芳香族 VOCs を選択除去するために CNTs 吸着剤を用いた初めての報告である。具体的には、6 種芳香族 VOCs と 17 種脂肪族 VOCs を含む汚染モデル気体試料は CNT 充填カートリッジを通過し、CNTs に吸着されなかった VOCs を活性炭へ吸着させた後、固液抽出/GC-MS 法を用いることによって定量分析した。その結果、CNTs は芳香族 VOCs を選択的に吸着することがわかった。この研究はまた、フロンティア軌道理論に基づき、CNTs による芳香族化合物の吸着に対する妥当性のある吸着機構を説明した最初の報告である。

B. 研究方法

VOCs を含むモデル気体試料の調製

市販されている 2 3 種揮発性有機化合物標準液 (1 mg/mL in methanol) は和光純薬から購入し、6 種芳

香族 VOCs (ベンゼン、トルエン、*o*-, *m*-, *p*-キシレン、*p*-ジクロロベンゼン) と 17 種脂肪族 VOCs (1, 1-ジクロロエチレン、ジクロロメタン、*trans*-1, 2-ジクロロエチレン、*cis*-1, 2-ジクロロエチレン、クロロホルム、1, 1, 1-トリクロロエタン、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン、トリクロロエチレン、1, 2-ジクロロプロパン、プロモジクロロメタン、*cis*-1, 3-ジクロロプロペン、*trans*-1, 3-ジクロロプロペン、1, 1, 2-トリクロロエタン、テトラクロロエチレン、ジブロモクロロメタン、プロモホルム) が含まれる (Figure 2-1)。ただし、*m*-, *p*-キシレンは GC にて分離が不可能のため、併せて 1 mg/mL に調製されている。この VOCs 標準液を、常圧で前もって純空気を充填した 10 L テドラーバックへマイクロシリンジで一定量注入した。このテドラーバックの注入口を閉じ、80°C の乾燥機中で 1 時間放置する事によって、VOCs 混合溶液は完全に気化させた。本研究における吸着実験は全て、同様の手法によって調製したモデル気体試料を使用した。

● 高結晶度多層カーボンナノチューブ

本研究において主に用いた高結晶度多層カーボンナノチューブ (highly crystalline multi-walled carbon nanotubes: HC-MWCNTs) は、まず最初に、フェロセンを触媒前駆体、トルエンを炭素原料とし、水素をキャリアガスに用いる浮遊反応剤法 [20-22]、具体的には、約 1200°C の反応炉に一定量のフェロセンを含むトルエンを導入することによって、“as-grown” の CNTs を生成した。しかし、この CNTs には、大量のアモルファスカーボンが混入しているため、本来のグラファイト構造の特性を十分に発揮できない。そこで、生成した CNTs を更に、高純度アルゴン雰囲気中 2600°C で 30 分熱処理することによって、HC-MWCNTs を得た。また、化学気相成長法 (CVD) 法で作製した、アモルファスカーボンを多く含む “as-grown” の MWCNTs と SWCNTs および日機装製の HC-SWCNTs (外径 2 nm) を用いて HC-MWCNTs 吸着剤との比較に用いた。

● CNT 充填カートリッジの作製

CNT 充填カートリッジは、メタノール中の CNTs を超音波洗浄機 (42 kHz) で分散させた後、空のカートリッジ (円筒状プロピレン製、長さ 16.5 mm、内

径 10 mm) へ吸引ポンプによって吸引しつつ導入した。最終的にカートリッジへ導入された CNTs の乾燥重量は、約 80 mg であった。このカートリッジ内部の両端には、ポリプロピレンフィルター (10 μm) が設置され、CNTs の流出を防いでいる。

● VOCs の吸脱着

CNT 充填カートリッジの一端である注入口はサンプルバッグに接続し、もう一端を市販の活性炭チューブ (Sibata charcoal tube: 柴田科学製) に接続した。この活性炭チューブは、ガラスチューブに活性炭が充填されており、室内空気汚染物質分析や有機溶媒の作業環境測定を公定法に基づいて行うために用いられている。本研究において活性炭チューブは、CNT 充填カートリッジによって吸着されなかった VOCs を捕捉するために取り付けた。この活性炭チューブの另一端は、流量の調節が可能な流量計を接続した吸引ポンプに接続され、本研究における吸着実験は全て等流量で吸引することによって行われた。活性炭に捕捉された VOCs は、二硫化炭素で 30 分間浸漬することによって抽出された。抽出液にはトルエン-d8 を内標に加え、島津製作所製の GCMS-QP5050A を用いて定量分析を行った。CNTs に吸着された VOCs の量は、CNT 充填カートリッジを通過して活性炭に吸着された量を、サンプルバッグに注入した量から減算することによって得られた。これらの吸脱着実験は、全てのサンプルに対して最低 3 回以上行って評価した。

● 計算化学

本研究における分子軌道の計算は、富士通製の WinMOPAC (version 3.0.3) 半経験的分子軌道法計算ソフトウェアを用いておこなった。分子構造は、モデルハミルトニアン PM3 (Parametric Method 3) を用いてパラメーターを最適化した。このプログラムによって、芳香族 VOCs のすべての炭素原子について分子配列、フロンティア軌道電子エネルギーおよび電子密度が最適化された。PM3 の計算パラメーターは、763 種類の分子の生成熱、構造、イオン化ポテンシャルおよび双極子モーメントの最小自乗法を行うことによって 12 種の原子 (H, C, N, O, F, Al, Si, P, S, Cl, Br, I) の情報を得ることができる。そこで、非経験的近似で、可能な限り正確な計算が

されている *ab initio* 法による計算結果と本研究で用いた PM3 法による計算結果をフロンティア軌道エネルギーのうち、最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital: HOMO) について比較してみると、それぞれの化合物 (*ab initio*, PM3) は、ベンゼン (-9.82 eV, -10.12 eV), トルエン (-9.70 eV, -9.81 eV), *m*-キシレン (-9.43 eV, -9.72 eV), *p*-キシレン (-9.60 eV, -9.59 eV) および *o*-キシレン (-9.44 eV, -9.71 eV) が得られ、おおよそ文献値と一致した。

C. 研究結果

● HC-MWCNTs の特性

図 1 は HC-MWCNTs の低倍率 (図 1-1) および高倍率 (図 1-2) の SEM 画像を示す。チューブの外径が 40 - 90 nm であることが観察され、カーボンナノ粒子も同時に観察できる。X 線元素分析によると、HC-MWCNTs に含まれる金属不純物は 450 ppm 以下であった。BET 法による窒素吸着によって得られた HC-MWCNTs の比表面積は、25 m^2/g であった。

図 2 はラマン分光分析によって得られた HC-MWCNTs のスペクトルを示す。CNTs の結晶純度は、ラマン分光法を用いて、炭素原子の六角格子内の振動に由来しているグラファイトカーボン特有のグラファイトバンド (G バンド: G) とグラファイト面の乱れや欠陥、すなわち、 sp^2 結合だけではなく、 sp^2 および sp^3 結合の混合部位から観測されるアモルファス成分のダングリングバンド (D バンド: D) に由来するピークの強度比 $R (=D/G)$ によって判断される。HC-MWCNTs のラマン分光分析結果より、G バンド (1582 cm^{-1}) よりも D バンド (1350 cm^{-1}) は遙かに小さく、 R 値は非常に小さな値が得られた。また、非常に強い G' バンド (2700 cm^{-1} , 共鳴に基づく 2 次ラマン散乱) も得られ、HC-MWCNTs は対称性が良いことがわかる。

● HC-SWCNTs の特性

図 3 は、SWCNTs の SEM 画像を示す。この写真より、外径 2 nm の SWCNTs が凝集することによって形成された、0.1 $\cdot\text{m}$ 以下の様々な太さの束が観察された。この SWCNTs をラマンスペクトルで分析すると、D バンドが観測されず、G バンド (1590 cm^{-1}) のみが観

測され、CNTsの結晶性の指標となるR値 ($R = D/G$)は非常に小さな値をとった。また、Gバンドの約1565 cm^{-1} にシヨルダーピークが観測された。これは、両端が筒状に閉じているSWCNTsの構造に由来する、ゾーンフォールディング効果によるピークであり、グラファイトやMWCNTsには観測されない。これらの結果より、HC-SWCNTsは、非常に結晶性が高く、グラファイト表面とVOCsの相互作用による吸着の評価が可能であることがわかる。また、本研究で用いたSWCNTsの77.35 Kにおける窒素のSWCNTsに対するBET法による吸着を測定した結果、比表面積測定値は、299 m^2/g であった。

● 吸着実験

CNT充填カートリッジを23種VOCsのための吸着剤として用いた場合、CNTsからの溶出は非常に困難である。なぜならば、VOCsは揮発性が非常に高く、カートリッジから直接溶出させた場合、大気中にも多く揮散する。また、カートリッジからCNTsを取り出し、公定法に基づく二硫化炭素溶媒抽出を用いた場合、溶媒にCNTsが分散され、マイクロシリンジを用いてGC-MSへ導入することが困難である。それゆえ、正確な抽出率を見積もることができない。この問題点を解決するために、CNT充填カートリッジの出口に、公定法で用いられている活性炭チューブを接続し、吸着実験を行った。吸着後の活性炭チューブから活性炭を取り出し、二硫化炭素へ30分間浸漬することによってVOCsは抽出され、直接GC-MSへの導入を可能とした。

表1はCNT充填カートリッジを接続せず、活性炭チューブのみを用いてモデル気体サンプルから添加回収実験を行った結果を示す。テドラーバッグへVOCs標準混合液を添加し、それぞれ、50、60、70および80℃にて1時間かけて揮発させた。回収率は揮発温度に対してわずかに依存性があり、80℃で揮発させたときに最も良好な結果が得られ、回収率93.9-106.3%であった。従って本法においては、CNTカートリッジに吸着されなかった成分が活性炭のチューブによって完全に吸着されるため、注入した23種VOCs量から活性炭への吸着量を原産することによって、CNTカートリッジへの吸着量が得られた。(HC-CNTsの芳香族VOCs選択性)

図4は、2種HC-CNTsの23種VOCs混合気体に対する平均吸着量 ($\mu\text{g-VOC/g-HC-CNT}$)を示す。いずれのHC-CNTs充填カートリッジも、*p*-ジクロロベンゼン、*o*-キシレン、*m*-*p*-キシレン、トルエンおよびベンゼン(すなわち芳香族VOCs)を大きく吸着した。HC-SWCNTsおよびHC-MWCNTsの芳香族VOCsに対する吸着量 ($\mu\text{g/g}$)はそれぞれ、*p*-ジクロロベンゼン(6198, 1048.3)、*o*-キシレン(5859, 771.7)、*m*-*p*-キシレン(5723, 740.3)、トルエン(3396, 274.1)、そしてベンゼン(2382, 178.6)であり、これらの吸着量の差は、HC-CNTsの表面積の差に大きく依存しているためであると考えられる。また、HC-CNTsを用いた吸着実験による選択性はいずれも、*p*-ジクロロベンゼン > *o*-キシレン > *m*-*p*-キシレン > トルエン > ベンゼン >> その他脂肪族VOCsであった。ただしこのとき、HC-SWCNTsを用いた吸着実験における100-500 $\mu\text{g/L}$ のモデル気体サンプルに対して*p*-ジクロロベンゼンおよび3種キシレンは、SWCNTsにほぼ完全に吸着された。

● HC-MWCNTsの芳香族VOCs親和性

図5は、脂肪族および芳香族VOCsの代表として、*cis*-1,2-ジクロロエチレンおよび*p*-ジクロロベンゼンを用いたHC-MWCNTsへの各個吸着実験結果を示す。等重量のHC-MWCNTに対して、それぞれのVOCs濃度を変化させて吸着実験を行ったところ、いずれもモデル気体に含まれる濃度が増加するにつれ、その吸着量は増加した。この結果より、HC-MWCNTsを用いたVOCsの単独吸着は、近似直線の傾きより、*p*-ジクロロベンゼンは*cis*-1,2-ジクロロエチレンの約4倍の吸着親和性を持つことがわかった。即ち、脂肪族VOCsよりも芳香族VOCsの方がCNTsへの親和性が高いため、VOCs混合気体においては芳香族選択性が高い結果が得られたと考えられる。

● 芳香族VOCs吸着温度の影響

HC-MWCNTsへの吸着量が大きな芳香族VOCs(*m*-*p*-キシレン、*o*-キシレンおよび*p*-ジクロロベンゼン)を選択し、それらに対する吸着温度の影響を調べた。吸着実験は、モデル気体とHC-MWCNTs充填カートリッジを恒温に保てるオープンに入れ、それぞれ25、40、50、60および70℃に調整して吸着実験を行った。

図 6 は、このときの各吸着容量 ($\mu\text{g VOC/g HC-MWCNT}$) と吸着温度 (K) の関係をプロットした。それぞれの吸着量は温度が上昇するごとに VOCs が CNTs 表面から脱着しやすくなるために減少したが、333 K において、4 つ全ての化合物の吸着量が上昇した。この特徴はトルエンおよびベンゼンに対しても同様にみられたが、脂肪族 VOCs に対してはみられなかった。この効果は活性炭吸着材を用いた時と同様に、*m* *p* キシレン、*o* キシレン、*p*-ジクロロベンゼンが平面構造をしているためにおこる“activated entry effects”として説明できる [25]。すなわち、高温になることで芳香族 VOCs が拡散しやすくなったことによって、より凝集体の深くに存在する CNTs への移動が容易になり、吸着量が一時的に増加する。

D. 考察

● HOMO-LUMO 相互作用

フロンティア軌道理論 [24, 26, 27] において、HOMO の最も電子密度の高い点が求核剤の反応点と、最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital: LUMO) の最も電子密度の高い点が求電子剤の反応点になっていることが知られている。そこで、平面型で形成される有機炭素化合物間の π - π スタッキングは、互いのフロンティア軌道エネルギー値が近い化合物同士がより強くなるという実験結果が報告されている [26] 事を論拠として考察した。本研究においては、CNTs が求核剤、VOCs が求電子剤と仮定して考察した。SWCNTs の理論計算による HOMO エネルギー値はおおよそ -4.9 ~ -5.1 eV であり [27]、本研究で用いた直径 2 nm の SWCNTs は、走査トンネル分光法 (STM/STS) を用いた実験値によるエネルギーバンドギャップは 0.5 eV である [28] ことが報告されている。

フロンティア軌道理論に基づき、芳香族 VOCs の HOMO および LUMO のエネルギー値を PM3 プログラムで算出した。表 2 はそれぞれの HOMO, LUMO および LUMO-HOMO の値とともに、SWCNTs の文献値を示す。それぞれの芳香族 VOCs のフロンティア軌道エネルギー値 (HOMO, LUMO) は、*p*-ジクロロベンゼン (-9.459, -0.428 eV)、*o*-キシレン (-9.701, -0.070 eV)、*m*-キシレン (-9.716, -0.070 eV)、*p*-キシレン (-9.592, -0.105 eV)、トルエン (-9.828, -0.039 eV) およびベンゼン (-10.945, 0.025 eV) であり、HOMO エネ

ルギー値の大きさおよび LUMO エネルギー値の小ささの順は、*p*-ジクロロベンゼン > *o*-キシレン \geq *m*-キシレン \geq *p*-キシレン > トルエン > ベンゼンの順であり、HC-CNTs への芳香族 VOCs の吸着選択性の順序に一致した。直径 6.7 Å の SWCNTs の理論計算値の HOMO および LUMO の値と VOCs の LUMO と HOMO の値を比較すると、それぞれの SWCNTs の HOMO と VOCs の LUMO の値は、VOCs の HOMO と SWCNTs の LUMO のエネルギー差よりも小さい。それ故に、SWCNTs が VOCs に π 電子を渡すことによって、相互作用がなされているとの仮説が立てられる。

このとき、PM3 プログラムを用いて算出した HOMO エネルギー値の妥当性を、*ab initio* 法による計算結果 [23] と比較したところ、これらの差は最大 0.3 eV 以下であり、計算値は妥当だといえる。

E. 結論

HOMO および LUMO のそれぞれの炭素原子における電子密度もまた、WinMOPAC プログラムで同様に算出した。HOMO における芳香族 VOCs の電子密度の高い部分、すなわち、CNTs と相互作用する炭素原子は、*p*-ジクロロベンゼン (C3: 0.3392, C6: 0.3392)、*o*-キシレン (C1: 0.5080, C6: 0.5082)、*m*-キシレン (C1: 0.4849, C3: 0.5078)、*p*-キシレン (C3: 0.5663, C6: 0.5563)、トルエン (C3: 0.5960, C6: 0.6118) およびベンゼン (C1: 0.5429, C4: 0.5429) が得られた。このとき、HOMO における電子密度の順位は、*p*-ジクロロベンゼン < *o*-キシレン < *m*-キシレン < ベンゼン < *p*-キシレン < トルエンであった。

これらの計算結果より、HC-CNTs による芳香族 VOCs の吸着メカニズムに対する新しい知見が得られた。それはすなわち、本研究における吸着モデルにおいては、高確率で π 電子は HC-MWCNTs の HOMO から芳香族 VOCs の LUMO に移動することが示唆された。一方、芳香族 VOCs のフロンティア電子 (HOMO) は、LUMO への π 電子移動が妨げられている。それゆえ、HOMO-LUMO エネルギーバンドギャップが小さな化合物ほど HC-CNTs に対する選択性が高い。たとえば、HOMO-LUMO バンドギャップが最も小さな *p*-ジクロロベンゼンは、他の化合物よりも LUMO へ電子を受容しやすいため、最も HC-CNTs によって多く吸着されて

いる。すなわち、芳香族 VOCs の HC-CNTs に対する選択性の順序 (*p*-ジクロロベンゼン) > *o*-キシレン > *m*-, *p*-キシレン > トルエン > ベンゼン) は、HOMO-LUMO エネルギーバンドギャップの順序に一致する。

本研究を以下に纏めることができる:

- (ア) 高い結晶性をもつカーボンナノチューブは、そのグラファイト表面の構造特性によって、VOCs 混合気体から、芳香族 VOCs を選択的に吸着することを可能とした。
- (イ) 本研究モデルにおける VOCs 混合気体に対する CNTs を用いた吸着実験では、CNTs の種類が異なったとしても、フロンティア軌道のエネルギー値から選択性を推し量ることができる。
- (ウ) 分子軌道法の視点からみると、HC-CNTs を用いた VOCs の吸着は・・・相互作用に依るため、一種の“弱い化学結合”による相互作用とみなすことができる。
- (エ) より大きな表面積を持つ HC-SWCNTs は、HC-MWCNTs よりも遙かに大きな吸着量を得た。
- (オ) R 値が増すにつれて、結晶性に由来した吸着選択性が減少した。
- (カ) CNTs は、新たな屋内空気環境中の芳香族 VOCs の除去に応用可能な吸着剤として利用することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. X. Tan, B. Fugetsu, Multi-walled carbon nanotubes interact with cultured rice cells: evidence of a self-defense response, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, 285-288 (2007).
2. H. Sone, B. Fugetsu, T. Tsukada, M. Endo, Affinity-Based Elimination of Aromatic VOCs by Highly Crystalline Multi-Walled Carbon Nanotubes, *Talanta*, 74 1265 (2008).
3. H. Yu, X. Chen, K. Tsujii, B. Fugetsu, Use of ultra-thin cross-linked polymer films for preparation of stable mono-dispersed carbon nanotubes, *Materials Letters*, 62, 4050-4052 (2008).
4. B. Fugetsu, E. sano, et al., Electrical conductivity and electromagnetic interference shielding efficiency of carbon nanotube/cellulose composite paper, *Carbon*, 46,

1256-1258 (2008).

5. 古月文志, カーボンナノチューブの1次元構造特徴を生かしたハイブリッドの開発, 月刊「ケミカルエンジニアリング」Vol153, No. 6, 72-79 (2008).
6. B. Fugetsu, E. Akiba, M. Hachiya, M. Endo, The production of soft, durable and electrically conductive polyester multifilament yarns by de-y-printing them with carbon nanotubes, *Carbon*, 47, 527-530 (2009).
7. H. sone, B. Fugetsu, S. Tanaka, Selective elimination of lead (II) ions by alginate/polyurethane composite foams, *Journal of Hazardous Materials*, 162, 423-429 (2009).
8. K. Kondoh, T. Threrujirapapong, H. Imai, J Umeda, B) Fugetsu CNTs/TiC Reinforced Titanium Matrix Nanocomposites via Powder Metallurgy and Its Microstructural and Mechanical Properties, *Journal of Nanomaterials Volume 2008* (2008), Article ID 127538, 4 pages.

2. 学会発表

1. 曾根弘昭, 古月文志, 「カーボンナノチューブを吸着剤とした揮発性有機物質の選択除去」, 『第16回環境化学討論会』, P245, 北九州, 2007年6月.
2. 曾根弘昭, 古月文志, 「カーボンナノチューブを吸着剤とした揮発性有機物質の選択除去」, 『第25回九州分析化学若手の会夏季セミナー』P01, 長崎, 2007年7月, (九州分析化学若手賞受賞)

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

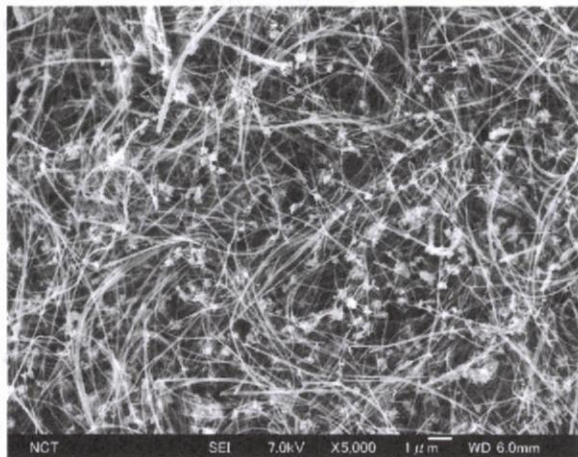


図 1-1

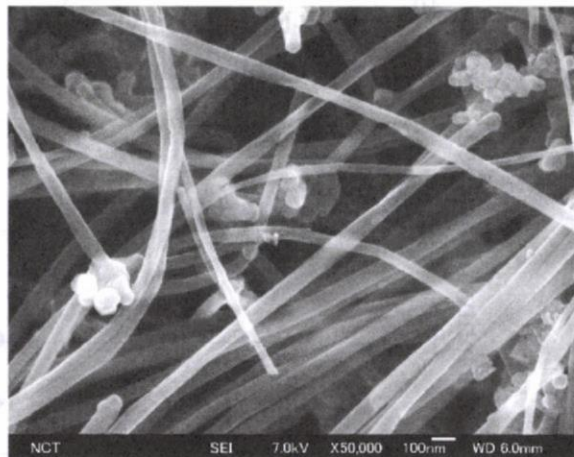


図 1-2

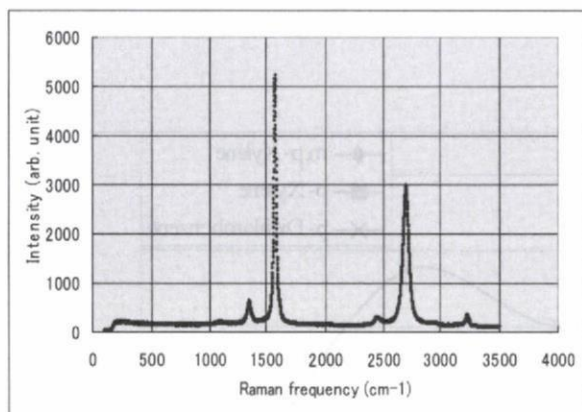


図 2

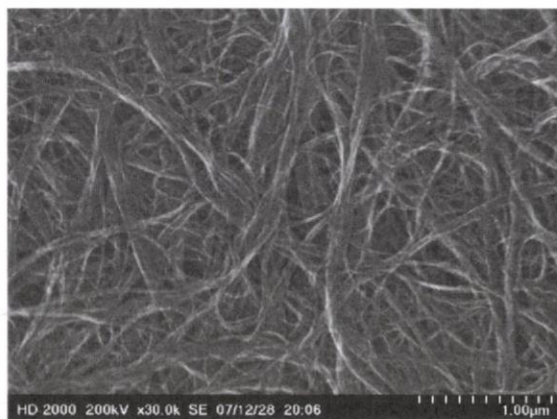


図 3

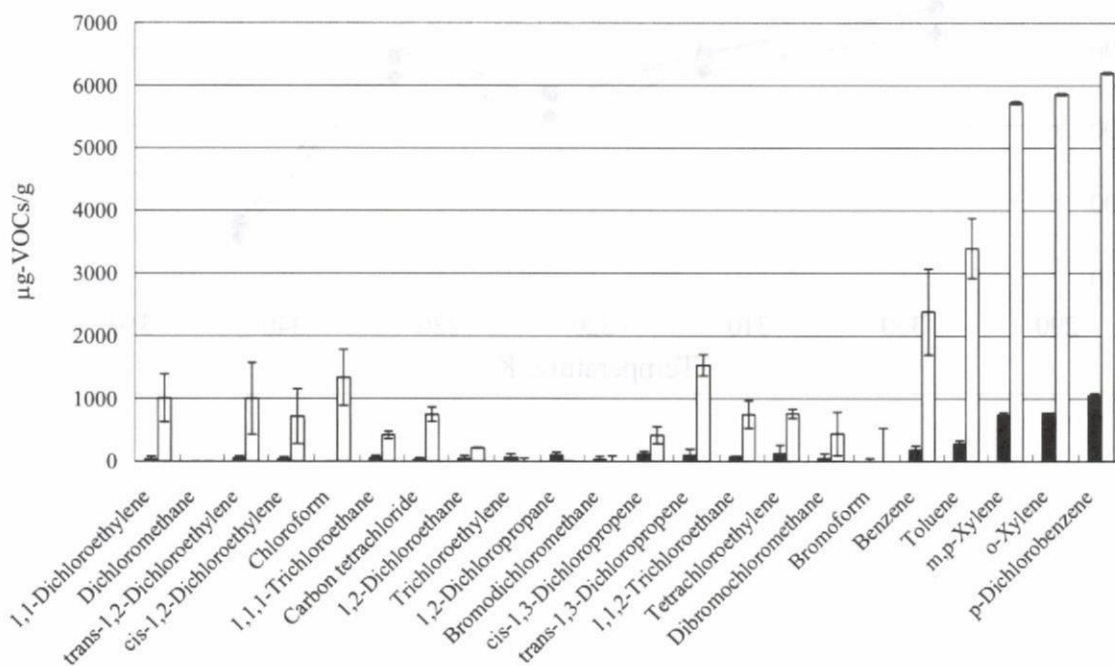


図 4 HC-MWCNT(黒カラム); HC-SWCNT(白カラム)

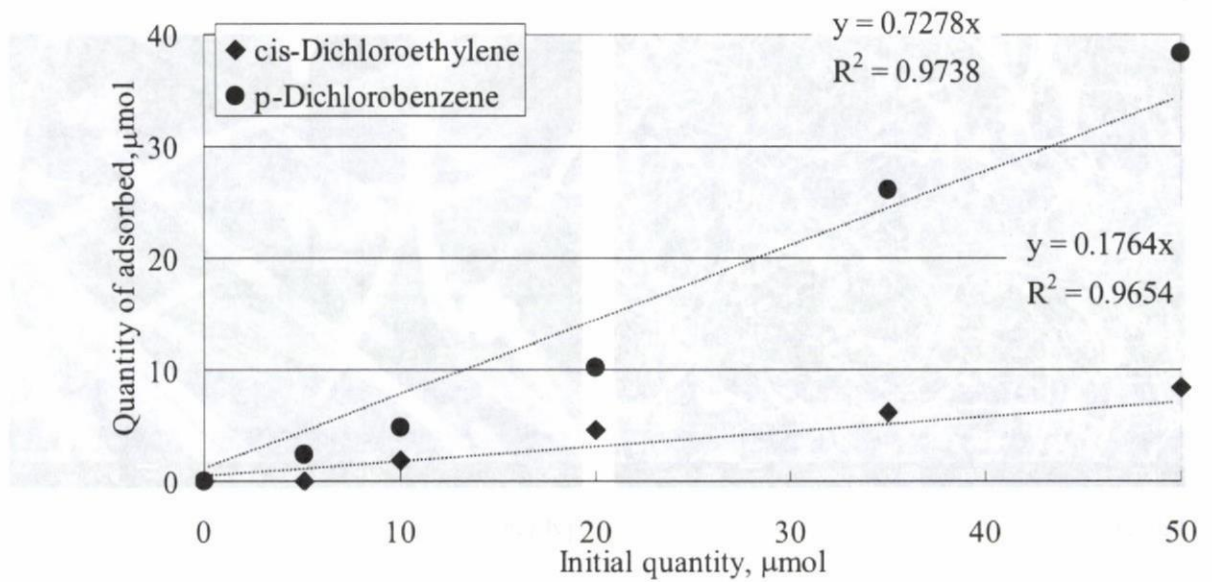


図 5

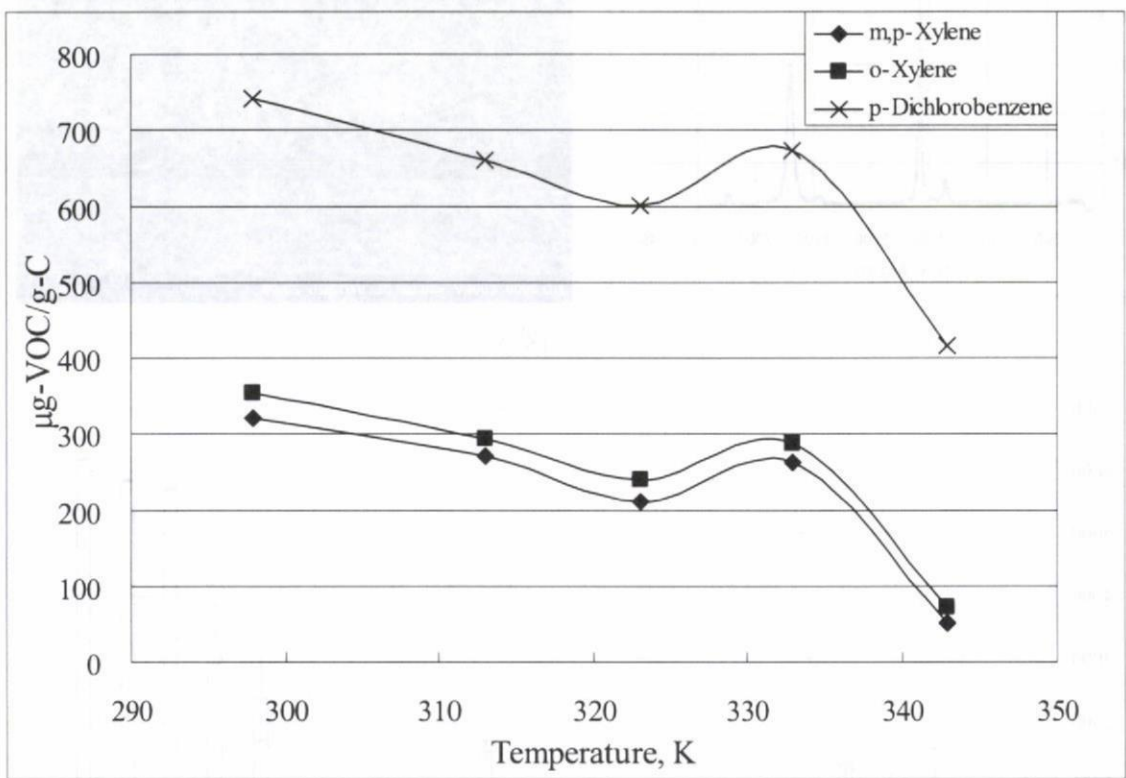


図 6

図 4 HC-WCNT(黒い管)の HC-2WCNT(灰色の管) に対する

表 1

Recovery (%)	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
1,1-Dichloroethylene	96.65	104.08	88.64	96.51
trans-1,2-Dichloroethylene	99.83	101.27	87.73	93.9
cis-1,2-Dichloroethylene	100.29	102.37	90.04	95.44
Chloroform	104.47	106.36	94.32	100.56
1,1,1-Trichloroethane	107.17	106.63	95.16	100.32
Carbon tetrachloride	107.99	103.95	94.21	98.25
1,2-Dichloroethane	103.05	101.62	92.89	97.17
Benzene	104.16	101.77	93.49	95.27
Trichloroethylene	106.99	102.99	95.16	99.75
1,2-Dichloropropane	105.43	109.92	92.99	96.29
Bromodichloromethane	107.14	101.92	95.54	99.88
cis-1,3-Dichloropropene	101.47	105.25	94.92	96.78
Toluene	105.04	107.66	96.08	96.86
trans-1,3-Dichloropropene	102.3	106.16	95.76	96.92
1,1,2-Trichloroethane	104.99	108.63	97.41	99.44
Tetrachloroethylene	104.88	108.92	96.72	100.63
Dibromochloromethane	101.32	109.19	97.23	99.6
m,p-Xylene	104.11	104.93	97.2	95.88
o-Xylene	102.58	102.88	96.08	94.99
Bromoform	101.48	104.78	97.04	106.39
p-Dichlorobenzene	87.53	88.24	90.7	91.61

表 2

VOCs	HOMO	LUMO	LUMO – HOMO
Benzene	-10.115	0.025	10.14
Toluene	-9.828	-0.039	9.789
<i>m</i> -Xylene	-9.716	-0.07	9.646
<i>p</i> -Xylene	-9.592	-0.105	9.487
<i>o</i> -Xylene	-9.701	-0.07	9.631
<i>p</i> -Dichlorobenzene	-9.459	-0.428	9.031
SWCNTs, Length: 15 Å			
φ: 4.0	-4.81	-3.11	1.7
φ: 5.4	-4.28	-4.03	0.25
φ: 6.7	-4.43	-3.88	0.55
SWCNTs, Length: 65 Å			
φ: 4.0	-4.88	-4.56	0.32
φ: 5.4	-4.88	-4.57	0.31
φ: 6.7	-5.02	-4.47	0.55

参考文献

1. S.K. Brown, M.R. Sim, M.J. Abramson, C.N. Gray, *Indoor Air*, 4 (1994) 123.
2. S.O. Baek, Y.S. Kim, R. Perry, *Atmos. Environ.* 31 (1997) 529.
3. P.O. Fanger, *Indoor Air*, 10 (2000) 68.
4. P. Wolkoff, G.D. Nielsen, *Atmos. Environ.* 35 (2001) 4407.
5. L.A. Wallace, E.D. Pellizzari, T.D. Hartwell, V. Davids, L.C. Michael, R.W. Whitmore, *Environ. Res.* 50 (1989) 37.
6. L.A. Wallace, W. Nelson, R. Ziegenfus, E. Pellizzari, L. Michael, R. Whitmore, H. Zelon, T. Hartwell, R. Perritt, *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.* 1 (1991) 57.
7. D. Das, V. Graur, N. Verma, *Carbon*, 42 (2004) 2949.
8. M. Peng, L.M. Vane, S.X. Liu, *J. Hazard. Mater.* B98 (2003) 69.
9. M.R. Tancerde, W.L. Zeise, E.A. Crouch, *Atmos. Environ.* 21 (1987) 2187.
10. J. Begerow, E. Keles, T. Koch, L. Dunemann, *J. Chromatogr. A*, 749 (1996) 181.
11. M.J. Ruhl, *Chem. Eng. Progr.* 89 (1993) 37.
12. M.A. Lillo-Rodenas, D. Cazorla-Amoros, A. Linares-Solano, *Carbon*, 43 (2005) 1758.
13. J.H. Byeon, J.H. Park, K.Y. Yoon, B.J. Ko, J.H. Ji, J. Hwang, *Carbon*, 44 (2006) 2089.
14. M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P.C. Eklund, "Science of Fullerenes and carbon nanotubes", Academic Press, 1996.
15. S. Iijima, *Nature (London)*, 354 (1991) 56.
16. D.S. Bethune, C.H. Kiang, M.S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vasques, R. Breyers, *Nature*, 363 (1993) 605.
17. R.Q. Long, R.T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2058.
18. Q. Li, D. Yuan, Q. Lin, *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 283.
19. E. Diaz, S. Ordonez, A. Vega, *J. Colloid and Interface Sci.* 305 (2007) 7.
20. M. Endo, M. Shikata, *Jpn. J. Appl. Phys.* 54 (1985) 507.

21. M. Endo, Chem. Tech., 18 (1988) 568.
22. Y.A. Kim, T. Hayashi, M. Endo, Y. Kaburagi, T. Tsukada, J. Shan, K. Osato, S. Tsuruoka, Carbon, 43 (2005) 2243.
23. M. H. Palmer, W. Moyes and M. Spiers, J. Mol. Struct., 49 (1978) 105.
24. K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquérol and T. Siemieniewska, Pure Appl. Chem., 57 (1985) 603-619
25. Y. Chiang, P. Chiang, C. Huang, Carbon, 39 (2001) 523.
26. A.S. Cooray, K.M.N. de Silva, J. Mole. Struct., 678 (2004) 223.
27. A. Galano, Chem. Phys., 327 (2006) 159.
28. J.W.G Wildöer, L.C. Venema, A.G Rinzler, R.E. Smalley, C. Dekker, Nature, 391 (1998) 59.

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

カーボンナノチューブが細胞に及ぼす影響に関する研究

分担研究者	戸塚靖則	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	高師則行	北海道大学歯学研究科助教
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	松岡真琴	北海道大学歯学研究科大学院生
主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授

研究要旨 本研究では、カーボンナノチューブ (CNT) 上で細胞を培養することで CNT の細胞に及ぼす影響を評価し、さらに、柔軟性や形成性に優れているものの生体親和性の乏しいシリコンラバーに対して CNT を応用することでこれまでより生体親和性の高い生体材料の開発を行った。まず、CNT を表面にコートしたディッシュ上で培養を行い増殖数の比較を行ったところ、CNT 上でも Culture dish 上とほぼ同等の細胞増殖を認めた。また、CNT 上で培養・継代を行った細胞も形態的、機能的な異常は認められなかった。さらに、シリコンラバー表面に CNTs をコートした材料を作成し細胞培養を行った結果、CNTs をコートしていないシリコンラバーに比べコートした方で約 10 倍の接着細胞数の増加が認められた。これらの結果より、CNT は細胞に対して強い毒性などは示さないことが明らかになり、CNT をシリコンに応用することで柔軟性を持ち生体親和性に優れた特色ある生体材料の開発が可能となった。

A. 研究目的

悪性腫瘍の治療には、抗がん剤などの化学療法や放射線治療、外科的手術など様々な治療法が行われており、通常、治療効果や患者に対する侵襲度を勘案しこれらの治療を複数組み合わせで行う。しかしながら、悪性腫瘍が進行した場合、広範囲の組織切除をとまう外科的手術が必要となる場合もある。特に口腔がんなど頭頸部での手術では、会話や摂食・嚥下に係わる機能の著しい低下などの大きな障害が残る。

現在、それらの欠損部に対してはチタンなどの金属プレートを用いた再建や、自己組織の移植などが行われている。骨などの硬組織部分は、チタンなどの金属製プレートを使用した再建を行うことができるが、軟組織を広範囲に切除した場合は柔軟性や生体親和性に優れた適切な人工再建材料が存在しないため、自家組織の移植による再建に頼らざるを得ない。しかしながら、自己組織を移植した場合、患部

に対する手術に加え、健常部の組織にたいしても大きな侵襲を加えることになる。

美容外科の分野では、シリコン材料が胸部や鼻へのプロテーゼとして使用されているが、シリコンは生体反応性が低く急性の炎症などは起こさないものの、組織への接着性が無く周囲組織の被膜形成並びに拘縮などによる変形などの問題が多い。

そこで我々は、カーボンナノチューブに着目し、これをシリコンの表面に修飾することで、生体親和性を向上できないかと考えた。カーボンナノチューブ (CNTs) は、その機械的・電気的特性からナノテクノロジーの様々な分野での応用が期待されている素材である。特にバイオ分野では CNTs 上での細胞培養などの研究が行われており、われわれの研究グループでも既に CNTs シート上での細胞培養を行い良好な増殖を認めている。

本研究では、シリコン表面に CNTs を修飾することで、これまでになかった特色ある生体再建材料の開

発を行うことを目的とし、以下の項目に関する検討を行った。まず、CNTが細胞へ及ぼす影響を評価するためCNT上で長期的に継代・培養を行い細胞に及ぼす影響について検討した。さらにシリコン表面にCNTを応用することが細胞親和性に与える影響に関して検討を行った。

B. 研究方法

単層カーボンナノチューブ：SWCNT（名城ナノカーボン社製、純95%以上）および、多層カーボンナノチューブ：MWCNT（NanoLab社製、純度99%以上）を分散液に加え超音波処理を行い、それぞれポリスチレンディッシュに薄層コートした（SW dish及びMW dish）。骨芽細胞様細胞（Saos-2）をCNTディッシュ上およびCulture dish（Corning）上で培養し、播種後1時間後、6時間後の接着細胞数を比較した。さらに3日後、6日後の細胞増殖を比較した。また、それぞれのディッシュ上で4日間培養した細胞中の生細胞の割合を比較した。

CNT上での長期的影響を評価するため、CNT dish上での継代・培養を行った。継代に先立ち、それぞれのディッシュ上で培養した細胞を0.1%トリプシン処理し、作用時間による回収率の変化を各ディッシュで比較した。さらにトリプシン濃度を変え、0.5%、0.1%、0.01%で20分間処理した細胞の回収率を比較した。次いで、約4週間CNTディッシュ上で継代・培養を行った細胞の各ディッシュ上での形態を走査型電子顕微鏡（SEM）で比較した。また、それらの細胞をCell culture dishに播種し、細胞形態をSEMで比較した。長期間CNT上で継代・培養を行うことによる活性の変化を比較するため、CNTディッシュ上で継代・培養した細胞をそれぞれCell culture dishに播種しアルカリフォスファターゼ染色を行った。

シリコンラバー表面へCNTをコートすることによる細胞反応性の変化を評価するため、シート状のシリコンラバー表面にSWCNTおよびMWCNTをそれぞれ1cm²あたり1μg、10μgコーティングし、シート表面で細胞培養を行い6日後の増殖細胞数の比較をおこなった。また、シート上の細胞をSEMで観察した。

C. 研究結果

SEMでの観察によりカーボンナノチューブがポリスチレンディッシュ表面をほぼ均一に覆っていることが観察できた（図1）。骨芽細胞様細胞（Saos-2）による接着試験では、播種して1時間後の接着細胞数はCulture dishで最も多く、SW dishはその半分程度であったが、6時間後ではほぼ同程度の接着を認めた（図2）。増殖細胞数の比較では、3日目ではCulture dishでの増殖数が最も多く、SW dishとMW dishではほぼ同程度であったが、6日目ではSW dishでの増殖数が最も多かった（図3）。生細胞の割合はすべてのディッシュ上で97%以上であった。

各ディッシュ上で培養した細胞を0.1%トリプシン処理した後の細胞回収率は、SW dishでは5分後で90%以上の回収率でありCulture dishよりも高かったのに対し、MW dishでは70%以下であった。また、MW dishではトリプシン処理を30分行った後も10%程度の細胞が残存していた（図4）。トリプシン濃度による比較では、SW dishではトリプシン濃度が0.01%でも95%以上の回収率であったのに対し、同じ条件下でのMW dishの回収率は60%以下であった（図5）。それぞれのCNTディッシュ上で継代・培養を続けた細胞をSEMで観察したところ、Culture dish上での細胞に比べ、MW dish上での細胞の方がより偽足が伸展しているのが観察された（図6）。また、それぞれの細胞をすべてCulture dish上に継代し、細胞形態の変化を観察したが、形態に大きな差は認められなかった（図7）。それぞれのディッシュ上で継代を続けた細胞をCulture dish上に播種した状態でALP染色を行ったところ、ほぼ同様に染色されていた（図8）。

シート状のシリコンラバー表面にCNTをコーティングし、シート表面で6日間細胞培養を行った結果、コートしていないシリコン上では殆ど細胞が認められなかったのに対し、CNTをコートしたシート上では細胞増殖数の著しい増加を認めた（図9）。特に、SWCNTをコートしたものでは1cm²あたり1μgコートしたもので強い効果を認めた。SEMで細胞観察したところ、細胞増殖数に示されたようにSWをコートしたものでかなり多くの細胞が増殖しているのが観察された。また、MWをコートしたシリコン上ではCNT量が多いものでは細胞増殖の増加を認め、さらにシート上の細胞の偽足が伸展しているのが観察された。

D. 考察

CNT ディッシュ上での接着・培養の結果より、CNT 上で骨芽細胞様細胞が良好に増殖するということが明らかになった。これは、長期的にCNT 上で培養した後も同様であり、それぞれの細胞をCNT 上で培養した状態では偽足の伸展など細胞形態の変化を示したが、CNT 上で長期的に細胞を継代した細胞をその後通常の条件に戻し培養したもので、形態や活性に変化がなかったことから、CNT 上で培養することでも細胞の形態や機能には大きな変化を残さないことが示唆された。これらの結果より、CNT を生体材料に用いることでも周囲細胞に大きな影響を及ぼさないであろうということが示唆される。しかしながら、これを明らかにするには、より長期的な検討や詳細な細胞形態の観察が必要となるだろう。

また、シリコンシートでの培養の結果より、CNT をシリコンの表面に使用することで、細胞増殖性を大きく向上させることができるということが明らかになった。MW をコートしたシート上では、SW と比べ細胞増殖性は大きくなかったものの、偽足の進展した細胞を多く認めた。これは、MW dish 上での細胞形態と同様であり、MW dish 上で細胞がトリプシン処理後も剥がれにくかったことから、MW シート上で細胞接着性が強いという可能性が考えられる。

これらの結果より、CNT を用いることでシリコンの表面の細胞接着性が向上することが明らかになり、CNT 上で細胞培養することでも細胞の機能や形態に大きな影響を及ぼさない可能性が示唆された。このことから、シリコンに CNT を応用することで、シリコンの柔軟性と CNT の特徴ある機能を持った生体再建材料や人工臓器の開発などが可能と考えられる。

E. 結論

CNT が長期的に細胞に及ぼす影響は少ないということが明らかになった。また、シリコンラバー表面での細胞増殖を著しく向上させることが可能になった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Noriyuki Takashi, Fumio Watari, Yasunori Totsuka, Inflammatory Exudates Modulate the Function and Apoptosis of Neutrophils, *Oral Science International*, Vol.5: No.2: 122-130 (2008)
2. Makoto Matsuoka, Tsukasa Akasaka, Takeshi Hashimoto, Yasunori Totsuka and Fumio Watari, "Improvement in cell proliferation on silicone rubber by carbon nanotube coating", *Bio-Medical Materials and Engineering*, in press (2009)

2. 学会発表

1. Makoto Matsuoka, Tsukasa Akasaka, Takeshi Hashimoto, Yasunori Totsuka, Fumio Watari, "Cell adhesion to CNT coated silicone rubber", *International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes*, Abstract P30, Sapporo, Japan, 2008
2. 松岡真琴, 赤坂司, 戸塚靖則, 亘理文夫, "シリコンラバー上での細胞接着", 平成 20 年度日本歯科理工学会 北海道・東北支部夏期セミナー 要旨集 P3 北海道, 千歳市, 2008
3. 松岡真琴, 赤坂司, 戸塚靖則, 亘理文夫, "高い細胞接着性と電気伝導性を併せ持つ生体再建材料の開発", 平成 20 年度秋季第 52 回日本歯科理工学会学術講演会 講演集 P358 大阪 2008
4. Makoto Matsuoka, Tsukasa Akasaka, Yasunori Totsuka, Fumio Watari, "Cell proliferation on flexible and electroconductive CNT coated silicone rubber", *Joint international meeting: 214th Meeting of ECS — The Electrochemical Society*, 2008 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan, Abstract CD-ROM, Honolulu, Hawaii, 2008
5. 松岡真琴, 赤坂司, 橋本剛, 戸塚靖則, 亘理文夫, "カーボンナノチューブディッシュ上での細胞培養", 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」, 第 5 回研究成果発表会 要旨集, P17-18, 北海道, 苫小牧, 2009

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

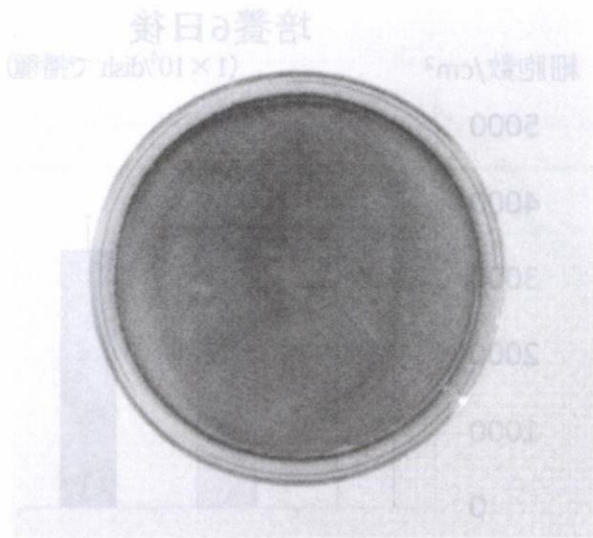


図1-1 カーボンナノチューブをコートしたディッシュ



図1-2 ディッシュ表面の構造 (SEMでの観察)

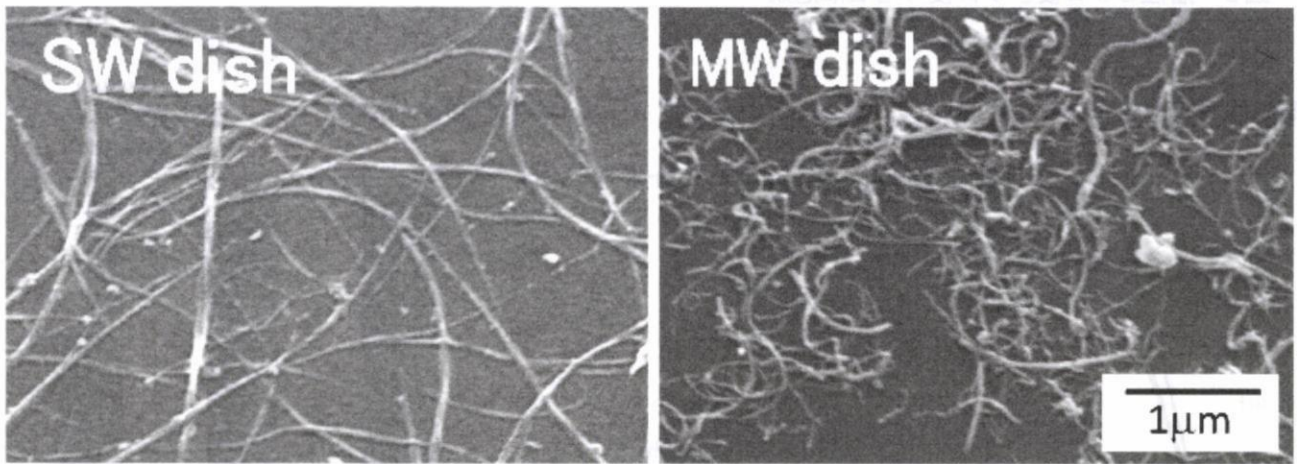


図2 接着細胞数 (1×10^5 /dish で播種)

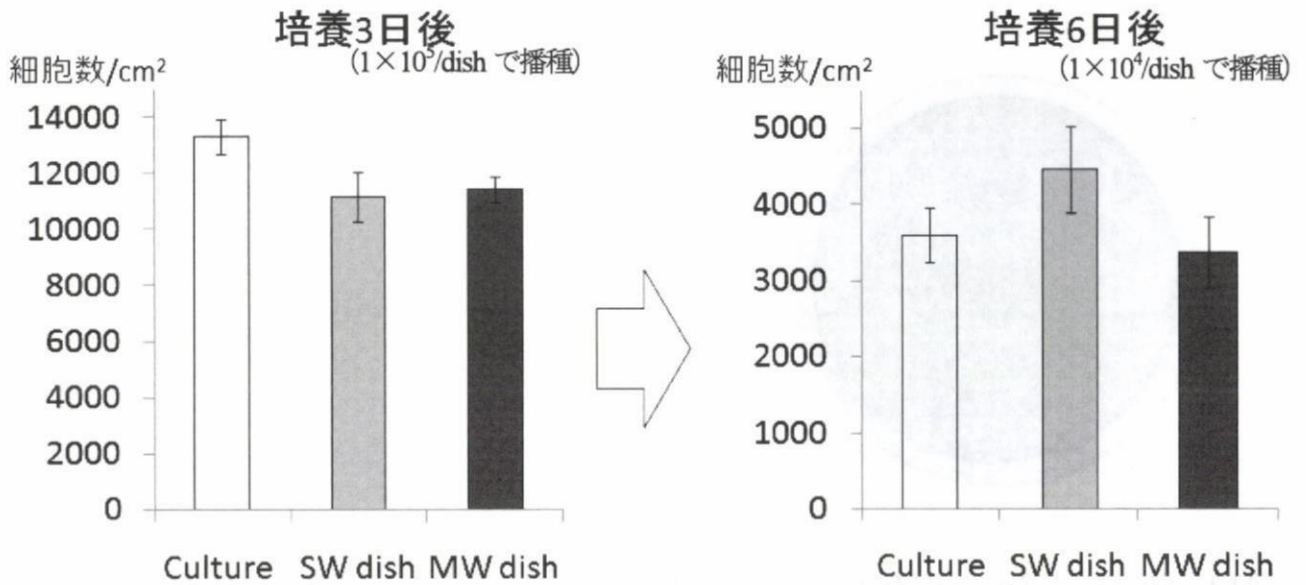


図3 播種し3日後と6日後の増殖細胞数

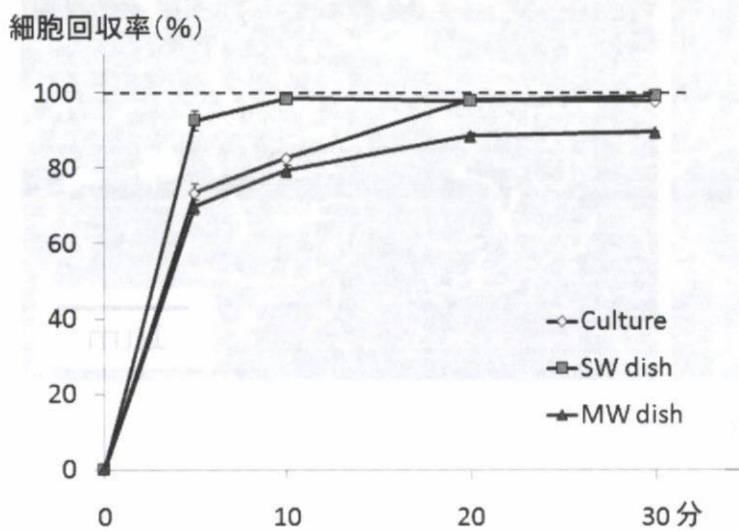


図4 0.1%トリプシン処理による細胞回収率の経時的変化

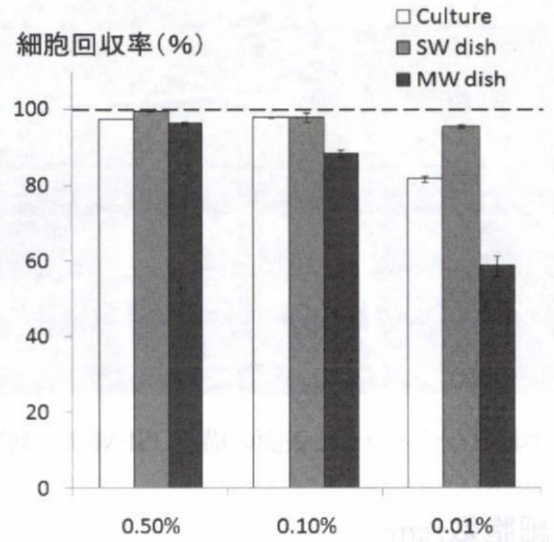


図5 トリプシン濃度による比較 (処理時間20分)

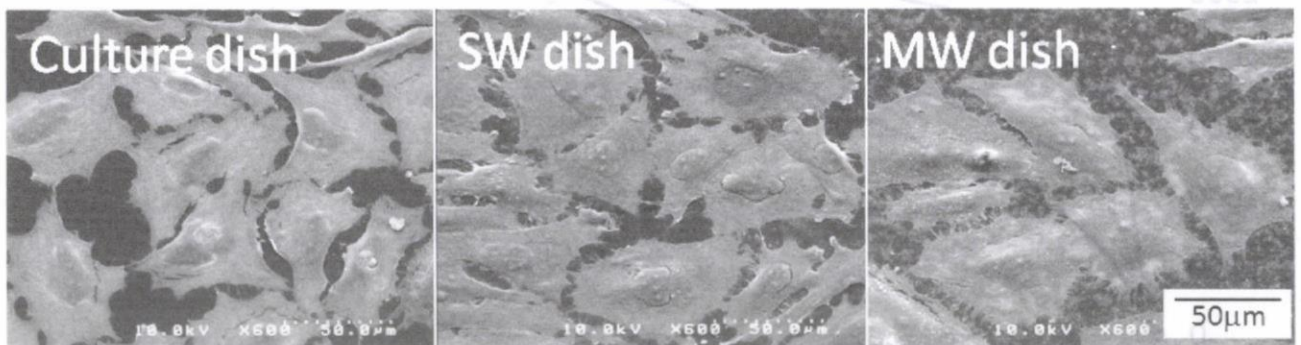


図6 各ディッシュ上で継代・培養した細胞のSEM観察象