

		試料中濃度 (ppb)					
		PBS	PBS sonication	single	single sonication	multi	multi sonication
Mn	55	nd	nd	0.33	16.04	nd	0.26
Rb	85	3.97	3.84	6.88	13.33	4.06	4.61
Cs	133	nd	nd	0.1	0.32	nd	0.59
W	182	nd	0.05	nd	0.08	nd	0.4
Tl	205	md	nd	0.05	0.17	nd	0.37
Fe	57	nd	nd	nd	7110	nd	nd

表 1. CNT 超音波処理によって溶出した金属

Multi, single の両サンプルともに 1 mg/ml で PBS に添加した。PBS に入れてすぐの上清、5 時間超音波処理した上清に含まれている金属について元素分析を行った。Mn, Rb, Fe については、Single の方が multi より超音波で溶出する金属量が多い。特に、Fe は multi では検出されないが、single では 7110 ppb にも上った。

CNT は日機装より供与された。

- ① 30 ナノクラス CNT (multi)
- ② 日機装量産単層カーボンナノチューブ (Lot. No. SW1S081016/081029-1F&1D) (single)

CNT は 1 mg/ml となるように PBS に添加し、10 min あるいは 5 hr 超音波処理を行った。この上清を培地で 1/10, 1/100, 1/1000 に希釈した。

1. 神経幹細胞に対する影響の検討

胎生 17 日齢ラット全脳を培地中でミンスし、EGF, FGF, B27 supplement を添加した培地により一週間培養した。Neurosphere が現れたら CNT 上清で 24 時間処理し、BrdU assay (Promega) により細胞増殖を、MTT assay (Millipore) により細胞毒性を検討した。

2. ミクログリアに対する影響の検討

哺乳 0-1 日齢ラット全脳をミンスし、トリプシン処理を行い、75 cm² フラスコに播種した。7-10 日後にフラスコを振とうして回収したミクログリアを 96 穴プレートに再播種し、CNT 上清で 24 時間処理し、MTT assay (Millipore) により細胞毒性を検討した。

3. 金属および薬物適用条件

昨年度、超音波処理により CNT から溶出すること

を明らかにした金属(表 1) Mn, Rb, Cs, Tl, Fe の検討のために、MnCl₂ (1-100 ppb), RbCl (1-100 ppb), TlCl₃ (0.1-10 ppb), FeCl₂ (100-10000 ppb), FeCl₃ (100-10000 ppb) をそれぞれ単独で培地に添加し、細胞を 24 時間処理した。また、金属の作用における reactive oxygen species (ROS) の関与を検討するため、作用の見受けられた金属と抗酸化剤である ascorbic acid (AA, 10-100 μM), N-acetyl cystein (NAC, 1-100 μM) を共添加した。(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱い、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法)および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

C. 研究結果

1. 神経幹細胞に対する金属の影響の検討

1-1 金属の神経幹細胞増殖に対する影響

Mn²⁺, Rb⁺, Tl³⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ は濃度依存的に神経幹細胞増殖を抑制した(図 2)。Mn²⁺ は 100 ppb

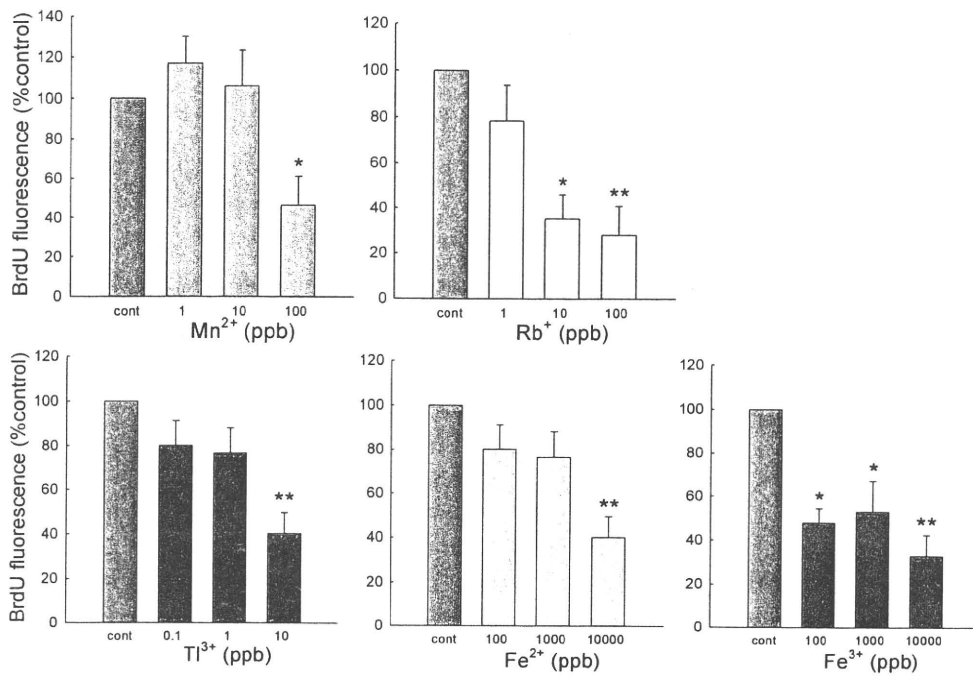


図2. 金属の神経幹細胞増殖に対する影響

Mn²⁺, Rb⁺, Tl³⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ で 24 時間処理すると神経幹細胞の増殖は有意に抑制された。(*: p<0.05, **: P<0.01 vs. control group, Tukey's test following ANOVA, N=12)

において、Rb⁺ は 10 ppb 以上の濃度において、Tl³⁺ は 10 ppb において、Fe²⁺ は 10000 ppb において、Fe³⁺ は 100 ppb 以上の濃度において有意な抑制作用が観察された。Cs⁺ は神経幹細胞増殖に何ら影響を及ぼさなかった (data not shown)。

1-2 金属の神経幹細胞増殖抑制作用における ROS の関与

Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ の作用を AA, NAC とともに濃度依存的に阻害した (図 3)。Rb⁺, Tl³⁺ の作用に対して AA, NAC は両者ともに影響を与えなかった

(data not shown)。

2. ミクログリアに対する金属の影響の検討

2-1 金属のミクログリアへの細胞毒性

Mn²⁺, Fe²⁺ は濃度依存的にミクログリア細胞毒性を示した (図4)。Mn²⁺ は 100 ppb において、Fe²⁺ は 1000 ppb 以上の濃度において有意な毒性を示した。Rb⁺, Tl³⁺, Fe³⁺, Cs⁺ はミクログリアに対して細胞毒性を示さなかった (data not shown)。

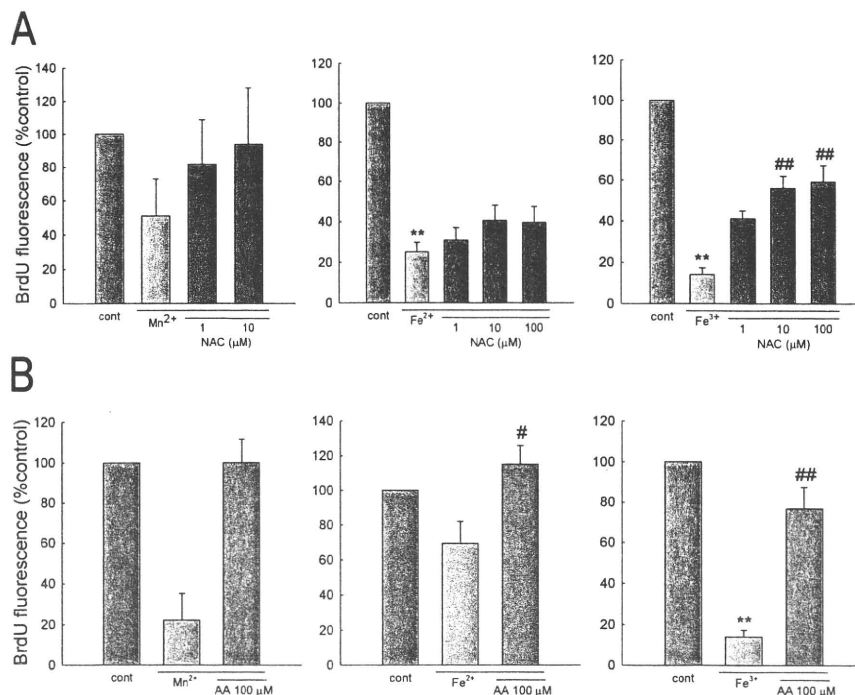


図3. 金属の神経幹細胞増殖抑制作用における ROS の関与

金属と NAC (A), AA (B) を共添加すると、Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ の作用が阻害された。(*: p<0.05, **: p<0.01 vs. control group, #: p<0.05, ##: p<0.01 vs. metal-treated group, Tukey's test following ANOVA, N=7)

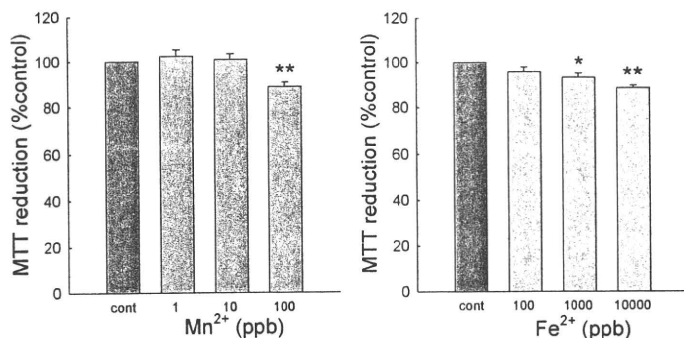


図 4. 金属のミクログリアへの細胞毒性

Mn²⁺, Fe²⁺ 24 時間処理はミクログリア細胞毒性を示した。(*: p<0.05, **: P<0.01 vs. control group, Tukey's test following ANOVA, N=12)

2-2 金属のミクログリア細胞毒性における ROS の関与

Mn²⁺, Fe²⁺ の作用を AA は濃度依存的に阻害した(図5)。それぞれ Mg²⁺ の作用に対しては 100 μM の濃度で、Fe²⁺ の作用に対しては 1000 μM の濃度で ほぼコントロールレベルまで回復した。

D. 考察

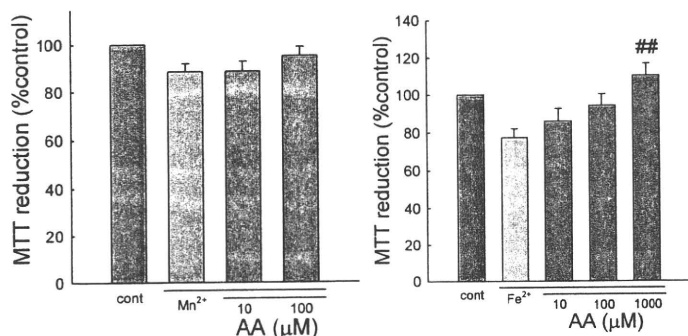


図 5. 金属のミクログリア細胞毒性における ROS の関与

金属と AA を共添加すると Mn²⁺, Fe²⁺ の作用が阻害された。(**: p<0.01 vs. metal-treated group, Tukey's test following ANOVA, N=30)

CNT と金属の神経幹細胞増殖とミクログリアに対する作用についてまとめると以下ようになる(表2)。神経幹細胞増殖作用、ミクログリア細胞毒性ともに single の方が multi より作用が強力である。

single の方が multi より超音波処理により高濃度の金属を溶出している点を考慮すると、CNT の作用における金属の関与が大きいことが示唆される。また、ミクログリア細胞毒性よりも神経幹細胞増殖の方が、より多種の金属に影響を受けていた。神経幹細胞増殖のほうがミクログリア細胞毒性よりも、より高検出力な毒性評価系であるといえる。ROS の関与は神経幹細胞増殖抑制では Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ に、ミクログリア細胞毒性では Mn²⁺, Fe²⁺ に見受けられた。Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ の作用には ROS が関与しているが、Mn²⁺, Fe²⁺ の作用が Fe³⁺ より強力であるため、ミクログリア細胞毒性はこれら 2 金属にのみに現れたことが推察される。また、Rb⁺, Tl³⁺ の神経幹細胞増殖阻害作用のメカニズムについては今後検討の必要がある。今後は個々の金属のキレート剤と CNT 超音波処理上清を共添加することにより、さらに金属の関与について検証を進める予定である。

ただし、これらの結果は CNT 自体の毒性を否定するものではない。超音波処理によって生じた CNT の微細断片が作用に関与する可能性を追求するため、これまでより強力な probe type の超音波破砕機を用いて検討を行う予定である。

E. 結論

CNT の超音波処理上清の神経幹細胞増殖抑制作用およびミクログリア細胞毒性に CNT から溶出する金属が関与していることを明らかにした。

F. 健康危機情報 なし

G. 研究発表

	CNT による作用強度	単独作用をもつ金属イオン	フリーラジカルの関与
神経幹細胞増殖阻害作用	Single>multi	Mn ²⁺ , Rb ⁺ , Tl ³⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺
ミクログリア細胞毒性	Single のみ	Mn ²⁺ , Fe ²⁺	Mn ²⁺ , Fe ²⁺

表 2. CNT、金属の神経幹細胞増殖抑制作用、ミクログリア細胞毒性 まとめ

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 佐藤 薫、重本一最上 由香里、大野泰雄、関野祐子、ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生、オリゴデンドロサイト新生を誘導する Neuro2010 (2010. 9, 神戸市)
2. 高橋華奈子, 中澤憲一、石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子、佐藤 薫、ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 substrate-gated conductance の調節 Neuro2010 (2010. 9, 神戸市)
3. 佐藤 薫、重本一最上 由香里、大野泰雄、関野祐子、生後初期脳におけるミクログリアの役割 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
4. 高橋華奈子, 中澤憲一、石井一野澤 玲子, 竹内 幸一, 関野祐子、佐藤 薫、ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 コンダクタンスの調節 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
5. 佐藤 薫、高橋華奈子、中澤憲一、石井一野澤 玲子、竹内 幸一, 関野祐子、ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 の基質依存的な調節 第84回 日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)
6. 高木 淳平、佐藤 薫、鈴木 岳之、パロキセチンはリポポリサッカライドによって引き起こされるグルタミン酸トランスポーター活性の低下を抑制する 第84回 日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)
7. 佐藤 薫、James E Goldman, 関野 祐子、生後初期脳のリスクアセスメントシステムの構築、日本薬学会第132回年会 (2011. 3, 静岡市)

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究分担報告書

研究課題名：ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情報の集積に関する研究

研究分担課題名：ナノマテリアルによる細胞内酸化ストレス評価法の開発に関する研究

研究分担者 奥 直人 静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室 教授

研究協力者 清水 広介 静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室 助教

カーボンナノチューブ（CNT）暴露によって生じる酸化ストレスに由来するヒトの免疫機能への影響を解明するために、CNT 暴露時のマクロファージ細胞の増殖への影響について調べたところ、CNT 低濃度暴露においては低濃度の過酸化水素存在下で見られるような、マクロファージ細胞の増殖促進作用を示した。一方で高濃度の CNT 暴露においては、細胞増殖抑制作用を示した。これらのことから CNT の暴露は、低濃度においては活性酸素を生じてマクロファージ細胞の増殖を促進する一方、高濃度においては毒性を示し、マクロファージの活性に影響を与えることが示唆された。

A. 研究目的

カーボンナノチューブ（CNT）は新たなナノマテリアルとして、今後幅広い分野における使用が期待されているが、ヒトへの健康被害については情報が少なく、またその評価を行うための実験系も統一されていない。今回、その評価系を確立するとともに CNT のヒトへの健康被害を調べるためにヒトの免疫機能に対する影響に焦点を当て、異物の排除において重要な役割を担っているマクロファージ細胞に対する影響に

ついて、細胞内酸化ストレス評価を念頭に置いた基礎的な細胞毒性としての検討を行った。

B. 研究方法

1. CNT 懸濁液の調製

J774A.1 細胞を用いた実験において CNT は、単層 CNT（SWCNT, 日機装量産）と多層 CNT（MWCNT, 30 ナノクラス）を用いた。各 CNT 10 mg を電子天秤（AE160, メトラー・トレド）にて秤量し、リン酸緩衝液（PBS）1 mL にそれぞれ懸濁した。その

後プローブ型ソニケーター (Sonifier 250, BRANSON) にて超音波処理 (Output 7) を 10 分間行い、得られた CNT 懸濁液を CNT 全画分とした。また CNT 全画分中の浮遊微粒子画分を得るために、遠心処理 (CF15RXII, 日立) を 3500 rpm (1200 x g) の条件にて 10 分間行い、得られた上清画分を CNT 浮遊微粒子画分とした。それぞれのサンプルについて PBS にて 10, 100 倍希釈 (全画分については 1000 倍希釈も) を行い、その後の実験に用いた。

RAW264 細胞を用いた実験において CNT は多層 CNT (昭和電工 VGCF) を用いた。CNT 1 mg を電子天秤にて秤量し、PBS 1 mL に懸濁した。その後プローブ型ソニケーターにて超音波処理 (Output 7) を 10 分間行い、得られた CNT 懸濁液を実験に用いた。

2. マクロファージ細胞の培養

マウスマクロファージ細胞株である J774A.1 細胞および RAW264 細胞を実験に用いた。それぞれの細胞は D-MEM (高グルコース含有、和光純薬) にペニシリン G (最終濃度: 100 units/mL, 和光純薬)、ストレプトマイシン (最終濃度: 100 µg/mL, 和光純薬) および非働化ウシ胎児血清 (最終濃度: 10%, ジャパン・バイオシーラム) を添加した培地中で 5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。

3. 細胞増殖阻害試験

J774A.1 細胞を 6×10^4 cells/mL となるように 10%ウシ胎児血清含有 D-MEM 溶液を用いて調整した。細胞懸濁液 200 µL を 96 穴細胞培養用マイクロテストプレート (BD ファルコン) の各ウェルに加え、CO₂ イン

キュベーター中にて 37°C で一晚培養した。10%ウシ胎児血清含有 D-MEM 溶液 180 µL で置換した後、CNT サンプル溶液 20 µL を加え 37°C で 24、48 時間インキュベートした。PBS にて細胞を 2 回洗浄した後、5%テトラカラーワン (生化学バイオビジネス) を添加した D-MEM 溶液を加え、3 時間 37°C でインキュベートした。その後マイクロプレートリーダー (Infinite M200, TECAN) にて吸光度 (測定波長: 450 nm, 対象波長: 630 nm) を測定し、生細胞数の算出を行った。

4. 炎症性サイトカイン発現への影響

J774A.1 細胞を 3×10^4 cells/dish となるように 6 mm ディッシュ (BD ファルコン) に播種し、CO₂ インキュベーター中にて 37°C で一晚培養した。10%ウシ胎児血清含有 D-MEM 溶液で 1000 倍希釈した各 CNT サンプル溶液に置換し、37°C で 24 時間インキュベートした。PBS にて細胞を 2 回洗浄した後、TRIzol LS 試薬 (インビトロジェン) を用いて全 RNA を抽出し、T-Primed First-Strand Kit (アマシャム) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA 溶液にマウス TNF-α または IFN-γ に対するプライマー (タカラバイオ) および SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ) を加えてリアルタイム PCR 反応を行い (TP-800, タカラバイオ)、CNT 暴露による炎症性サイトカイン発現への影響を調べた。

5. 過酸化水素存在下での細胞増殖試験

RAW264 細胞を 6×10^4 cells/mL となるように 10%ウシ胎児血清含有 D-MEM 溶液を

用いて調整した。細胞懸濁液 200 μL を 96 穴細胞培養用マイクロテストプレートの各ウェルに加え、 CO_2 インキュベーター中にて 37°C で一晩培養した。10%ウシ胎児血清含有 D-MEM 溶液で希釈した過酸化水素水溶液 (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 μM , 和光純薬) をに加え、 37°C で 24~72 時間インキュベートした。以降は前述の増殖阻害実験と同様の操作を行った。

6. 過酸化水素存在下での CNT 暴露による細胞増殖阻害試験

RAW264 細胞を、3000 cells/well となるように 10%ウシ胎児血清含有 D-MEM にて希釈した細胞懸濁液を 96 穴細胞培養用マイクロテストプレートに加え、 CO_2 インキュベーター中にて 37°C で一晩培養した。10%ウシ胎児血清含有 D-MEM 溶液で希釈した過酸化水素 (0, 1, 10 μM) および CNT (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 昭和電工 VGCF) をに加え、 37°C で 48 時間インキュベートした。以降は前述の実験と同様に行った。

C. 研究結果

1. J774A.1 細胞に対する CNT の細胞毒性

マウスマクロファージ由来細胞株 J774A.1 細胞に対する日機装量産 CNT (SW) および 30 ナノクラス CNT (30nc) の細胞毒性作用について検討を行った。細胞毒性の評価はテトラカラーワンを用いた MTT 改変法を利用した。

SW の全画分暴露 24 時間後では、今回用

いた最も高濃度 (10 倍希釈液) において強く細胞の増殖が阻害されており、希釈とともにその効果は減弱した (図 1)。またその効果は暴露 48 時間後においてさらに強くなることが確認された。また SW 浮遊微粒子画分についても濃度依存的に細胞毒性を示す傾向が見られた (図 2)。一方で 30nc の全画分暴露においても、10 倍希釈液暴露によって強い細胞毒性を示し、48 時間の暴露によって細胞はほとんど死滅していた (図 1)。また 30nc の浮遊微粒子画分においても SW と同様に濃度依存的な細胞毒性が観察された。(図 2)

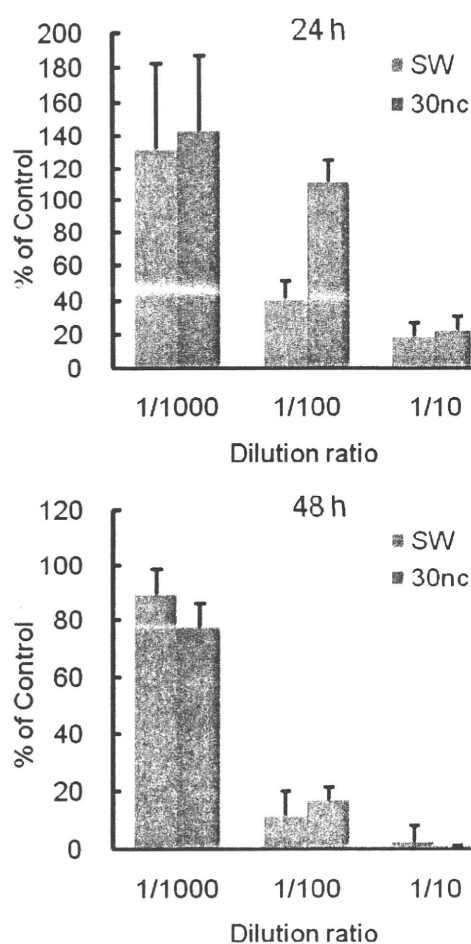


図 1 CNT 全画分暴露による J774A.1 細胞の増殖阻害

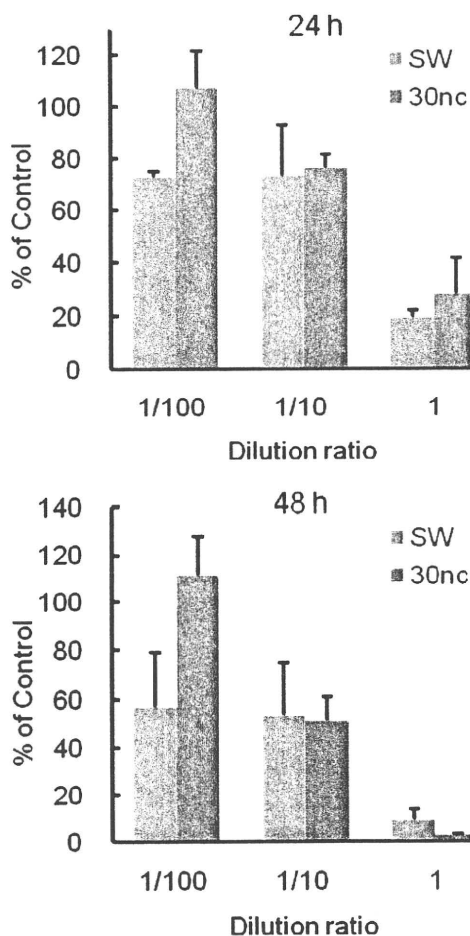


図 2 CNT 浮遊微粒子画分暴露による J774A.1 細胞の増殖阻害

2. CNT 暴露時の炎症性サイトカインの発現

異物の排除において重要な役割を担っているマクロファージ細胞は炎症性サイトカインを発現することにより、免疫機能を調節していることが知られている。そこで CNT 暴露によるマクロファージが産生する炎症性サイトカイン TNF- α および IFN- γ の発現への影響について、リアルタイム PCR 法を用いることにより調べた。暴露した SW および 30nc は前述の細胞増殖抑制試験においてあまり効果が見られなかった 1000 倍

希釈液を用いた。

SW では、暴露 24 時間後において TNF- α の発現はほとんど変化しなかったが、IFN- γ の発現は対照群に比べ 20%程度となり、著しく減少した。また 30nc 暴露についても TNF- α の発現はコントロール群に比べ約 80%と若干の発現減少が見られ、IFN- γ については対照群の 10%しか発現していないことが示された (図 3)。

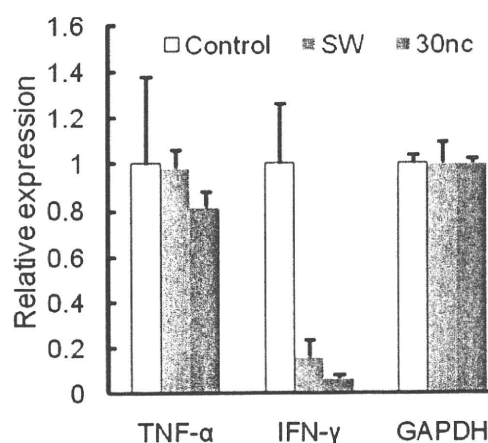


図 3 CNT 暴露による炎症性サイトカイン発現への影響

3. 過酸化水素存在下での RAW264 細胞増殖試験

活性酸素由来の酸化ストレスは細胞機能に大きく影響を与えることが知られており、マクロファージにおいても活性酸素の存在により増殖の阻害や炎症性サイトカインの発現減少などの報告が多数されている。本研究において活性酸素と CNT の関連を調べるための基礎検討として、活性酸素を惹起する物質として用いられている過酸化水素存在下におけるマクロファージ RAW264 細胞の増殖への影響について検討を行った。

実験は、過酸化水素 (0~1000 μM) 存在下において 24~72 時間培養した RAW264 細胞の増殖を、テトラカラーワンを用いて評価した。

過酸化水素 10 μM 添加では、20%程度の細胞傷害が確認され、30 μM 以上の添加では、24 時間の培養でほとんど全て死滅していた。一方、1 および 3 μM を添加した細胞においては、コントロール対照群に比べて増殖が促進されており、培養 72 時間後においては細胞数が約 1.5 倍に増加した (図 4)。

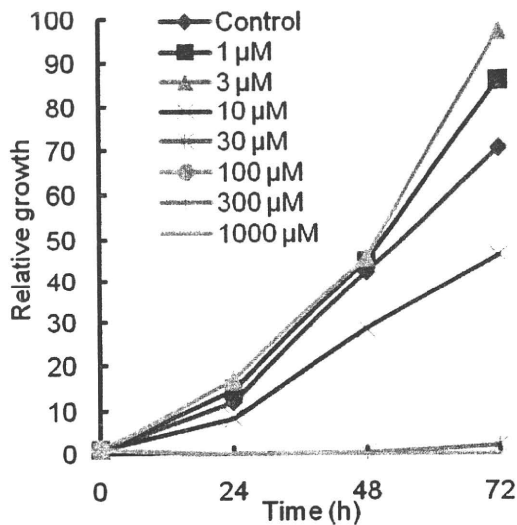


図 4 過酸化水素存在下での RAW264 細胞の増殖

4. 過酸化水素存在下での CNT 暴露による細胞増殖への影響

酸化ストレス惹起時の CNT の存在によるマクロファージ増殖への影響を調べるため、1 μM および 10 μM の過酸化水素存在下での CNT (昭和電工 VGCF) の RAW264 細胞の増殖に対する作用について検討を行った。過酸化水素非存在下においては、10

$\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度 CNT 暴露時、前述の SW や 30nc 暴露の時と同様に細胞増殖阻害作用が確認されたが、10 $\mu\text{g/mL}$ 未満の濃度暴露においてはその作用は認められず、むしろ 0.1 および 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 暴露時には増殖促進効果が確認された (図 5)。一方 1 μM の過酸化水素存在下においては、10 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度の CNT 暴露時には過酸化水素非存在下と同様の細胞増殖抑制作用されたが、低濃度の CNT 暴露で見られたような細胞増殖促進効果は減弱しているような傾向が示された。また 10 μM の過酸化水素存在下では、その細胞傷害作用が強くなってしまい、CNT 暴露による影響を調べるのは困難であった (図 5)。

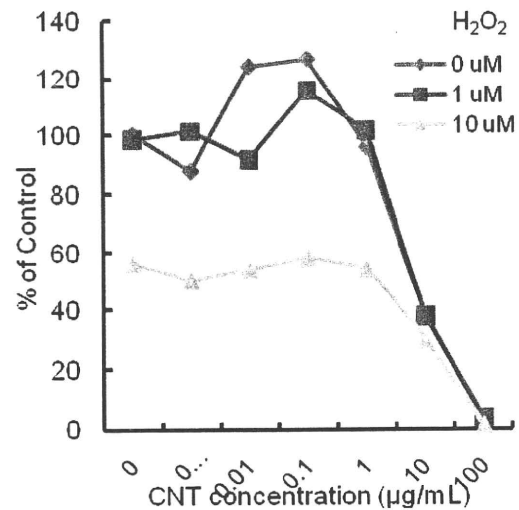


図 5 過酸化水素存在下での CNT 暴露による細胞増殖への影響

D. 考察

酸化ストレスの惹起は、免疫機能を含めヒトに健康被害を与える可能性が考えられるため、ナノマテリアル開発において酸化ストレス惹起の有無を調べることは非常に

重要である。今回、生体において異物排除の中心的役割を果たしているマクロファージ細胞への CNT 暴露による酸化ストレス惹起の有無ならびに免疫機能への影響を調べる手段として、マクロファージ細胞への毒性作用および炎症性サイトカイン発現に着目し、その評価系の確立ならびに実際に CNT 暴露を行った際のマクロファージ細胞へ影響を調べた。日機装量産 CNT および 30 ナノクラス CNT 全画分暴露では、マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 細胞の増殖が濃度依存的に抑制され、その作用は両 CNT の浮遊微粒子画分においても同様に確認された。このため CNT が細胞毒性を示すその本体は、遠心処理によっても沈殿しない微細となった CNT にある可能性が示唆された。また日機装量産 CNT および 30 ナノクラス CNT の間には増殖抑制作用に特に大きな違いは見られなかったことから、CNT のマクロファージ細胞の増殖阻害作用には、単層および多層の構造上の違いはないことが示唆された。

マクロファージは様々なサイトカインを産生することで異物の排除を行い、生体防御機構に関与することが知られている。なかでも TNF- α は代表的な炎症性サイトカインであり、マクロファージが異物を認識した際には産生が亢進し、免疫機構が誘導されることが知られている。そこで CNT を暴露した際の J774A.1 細胞における炎症性サイトカインの発現について検討を行った。その結果、日機装量産 CNT および 30 ナノクラス CNT 1000 倍希釈濃度の暴露では、

TNF- α の発現はあまり変化が見られなかったが、IFN- γ の発現は非常に低くなることが明らかとなった。IFN- γ はナチュラルキラー細胞などが発現する炎症性サイトカインで、マクロファージの活性化を誘導することが知られているが、マクロファージ自体の発現についてはあまり知られていない。今回、CNT 暴露によりマクロファージ細胞における IFN- γ 発現を低下させたことにより、免疫機構への影響は少なからずあることが示唆された。今後は暴露濃度や暴露時間などの検討を行うとともに、免疫誘導時における CNT 暴露による炎症性サイトカイン発現への影響について調べることで、生体防御機構における CNT 暴露の影響について詳しく調べて行くことが必要である。

一方、昭和電工 VGCF を用いた検討においては、CNT 高濃度暴露によって日機装量産 CNT および 30 ナノクラス CNT を用いた検討と同様に、強い細胞毒性作用が観察されたのに対し、低濃度暴露時には RAW264 細胞の増殖を促進した。このような作用は、予備検討として行った過酸化水素存在下での細胞増殖試験において、1 および 3 μM の過酸化水素添加により同様の効果が見られた。よって CNT 暴露により活性酸素が産生されて酸化ストレスが惹起され、増殖が促進された可能性が考えられた。詳細については今後、CNT 暴露時の活性酸素量や酸化ストレスのマーカー量を測定することにより明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

本検討において、CNTは高濃度暴露によってマクロファージ細胞に対して急性毒性を示した。またこれらの細胞毒性作用は、大きなサイズのCNTではなく、非常に微細となったCNTによるものであることが考えられた。またCNT暴露により、マクロファージ細胞の炎症性サイトカインの発現にも影響を及ぼすことが確認された。一方で低濃度のCNT暴露では、低濃度の過酸化水素存在下で見られたようなマクロファージ増殖促進作用が確認された。以上のことから、CNTは高濃度の暴露により直接的な細胞毒性作用を示し、低濃度の暴露では活性酸素を産生することで酸化ストレスを惹起する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究課題名：ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情報集積に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの血管系へ及ぼす影響に関する基礎的研究

分担研究者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

協力研究者：広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室長 室長

奥平 桂一郎 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 主任研究官

研究要旨

ナノマテリアルの血管系への影響評価として、多層 CNT (MWCNT) が炎症を誘発する可能性を検討した。動脈硬化モデルアポ E KO マウスの大動脈内壁に接着する細胞での炎症制御因子 NF- κ B の発現を解析したが、MWCNT 気管内投与は有意な差を示さなかった。In vitro では、MWCNT はヒト THP-1 マクロファージから炎症性サイトカイン IL-1 β 分泌を著しく促進した。この応答は細胞の食作用に依存し、caspase-1 の活性を必要とした。フラーレン(C60)は効果を示さず、分散が困難な他の MWCNT や SWCNT 製品では効果が低いことから、応答は MWCNT の形状や大きさに依存することが推定された。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルは産業用途となる特異な物理化学特性から、同一化学組成を持つ大きな構造体とは異なる生理活性やヒト健康影響に対する懸念をもたらす可能性があり、ナノマテリアルの物理化学的特性を考慮した有害性評価手法の開発が急務となっている。本研究では、懸念の高い慢性影響評価系の開発に関して、吸収されたナノマテリアルが体循環等を経由して及ぼす長期的な影響を検討すると共に、分子生物学的な変化を解析し、将来的な評価指標の確立をめざしている。

心血管疾患については、疫学的、実験的な研究から、環境中ナノ粒子 PM0.1 (<100 nm) と関連することが示唆されている。また産業用ナノマテリアルである単層 CNT (SWCNT) を動脈硬化モデルである apoE KO マウスの気道に滴下すると、

動脈硬化促進作用を示すことが報告されている。そこで本研究においては、多層 CNT (MWCNT) の動脈硬化病変への影響を検討した。MWCNT は腹腔投与でマウスに炎症を誘発することが知られている。本年度は動脈硬化病態を増悪する因子でもある炎症に着目し、血管内壁における炎症制御因子 NF- κ B の発現増加、また MWCNT が炎症性サイトカイン産生を促進する可能性について in vitro での検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は MWCNT-7 (ナノカーボンテクノロジー社, Lot No. 060125-01k) および 30 ナノクラス (30CNT、日機装) および単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は日機装のものを、フラーレン (C60)

はフロンティアカーボン社(nanom purple SUH, >99.9%)を用いた。Phosphatidylcholine (PC)はAvanti 社 (卵由来、#840051P)、phosphatidylglycerol (PG) (卵由来#P8318) はSigma 社のものを用いた。サイトカイン測定にはBio-Rad 社のBio-Plex マウスサイトカイン 8-Plex アッセイキット、あるいはミリポア社のMILLIPLEX™MAP アッセイキットを用いた。

2. MWCNT およびフラーレン(C60)の分散

MWCNT (MWCNT-7) は0.5%Tween 20を含むPBSに5 mg/mLの濃度で懸濁し、1分間バス型超音波発生装置で処理を行い分散した。この溶液を肺サーファクタントの脂質成分であるPC/PGのリポソーム溶液(30 mg/mL)を用いて0.4 mg/mLに希釈した。引き続き5分間超音波処理を行い、30Gの注射針(O.D.0.31mm)を通してホモジナイズしたのち、PBSで最終濃度0.2 mg/mL(0.02% Tween 20、PC/PG 15 mg/mL)に希釈した。PC/PG溶液はあらかじめ以下のように調製した。PCおよびPGの100 mg/mL chloroform 溶液をガラス試験管中で2:1の割合で混合し、窒素ガスで溶媒を留去する。フィルム状になったリン脂質にPBSを加えリン脂質濃度を30 mg/mLとし、vortex後、バス型超音波発生装置で1分間処理を行いリポソーム様に分散した。

日機装の製品であるMWCNT(ナノクラスCNT)およびSWCNTについては、0.5%Tween 20を含むPBSに5 mg/mLの濃度で懸濁した後、ポリトロン処理(20秒 x 数回)を追加した。

フラーレンはトルエンに溶解し、PC/PGはそれぞれのCHCl₃ストック溶液をナス型フラスコ中で混合し、ロータリーエバポレーターにより溶媒を蒸発させ、真空乾燥機で一晩乾燥させた。PBSを加えて10mMに調整、攪拌し、凍結融解を3回繰り返し、バス型超音波発生装置で30分、カップホーン型超音波発生装置で1分×5回の処理を行った。最終的に濃度0.2 mg/mL(0.02% Tween 20)になるようにPBSで希釈した。

3. 大動脈内壁における炎症マーカーNF-κB発現解析

昨年度の研究において、高脂肪・高コレステロール食を与え8週間飼育した雄ApoE KOマウス(9週齢)に、MWCNTを2週間毎に4回気管内投与し、8週間後に採取した大動脈を用いた。大動脈は凍結切片を作成後固定し、p65-NF-κB抗体(F-6, Santa Cruz Biotechnology)ならびにヘマトキシリン染色した。

4. マクロファージ系細胞からの炎症性サイトカイン放出の測定

ヒト単球由来THP-1細胞は24wellプレートに播種し、0.3μM PMAと10%FCSを含むRPM1培地中で72時間培養してマクロファージ様に分化し、さらにPMAを除いた培地中で24時間培養したのちに、PC/PG分散MWCNT、フラーレンのPC/PG分散溶液、あるいは対照となる溶剤(PC/PG溶液)を培地に添加し24時間培養した。培養上清を回収後、Bio-Plex Suspension Array SystemあるいはMILLIPLEX™MAPアッセイを用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

C.研究結果

1. 大動脈内壁での炎症反応

昨年度の研究で、動脈硬化モデルApoE KOマウスにMWCNTを気管内投与し、大動脈起始部弁輪部の切片ならびに大動脈内壁への脂質沈着への影響を調べた。その際に作成した大動脈切片を用い、本年度はMWCNTの気管内投与が血管内壁での炎症反応に及ぼす影響を解析した。NF-κBは炎症性サイトカインにより活性化され、炎症反応の制御に中心的役割を果たす転写因子であることから、血管内膜に接着する細胞でのNF-κB活性化を調べた。NF-κBのサブユニットのうち、IL-1やIL-8、接着分子の転写活性化に関わるp65に対する抗体を用いて細胞内のNF-κBを染色すると、血管内皮細胞および内皮に接着する

単球に多くの発現が認められた。内膜に接着する細胞をカウントし、NF- κ B ポジティブな細胞の割合を計測したところ、コントロールマウスでは $90.0 \pm 8.2\%$ (n=6) であるのに対して、MWCNT 投与群では $94.5 \pm 2.6\%$ (n=6) であり、有意な差は認められなかった。

2. マクロファージからのサイトカイン IL-1 β 産生に及ぼす MWCNT、SWCNT、カーボンナノチューブの影響

PMA でマクロファージ様に分化したヒト THP-1 細胞を用い、炎症性サイトカイン IL-1 β 分泌に及ぼす MWCNT の影響を検討した。MWCNT (MWCNT-7) を肺サーファクタントの脂質成分 PC/PG で分散して細胞培地に添加し、24 時間の IL-1 β 分泌量を測定した。PC/PG 溶液のみを添加したコントロール細胞からの IL-1 β 分泌は 38 ± 12 pg/mL であったが、MWCNT-7 を添加すると $2.2 \mu\text{g/mL}$ の濃度で 837 ± 65 pg/mL、 $4.4 \mu\text{g/mL}$ では 1295 ± 110 pg/mL、 $6.6 \mu\text{g/mL}$ では 1541 ± 33 pg/mL に IL-1 β 分泌が増加した (図 1)。しかしながら細胞の食作用を阻害する cytochalacin D ($1 \mu\text{M}$) で 30 分間前処理すると、MWCNT-7 による IL-1 β 分泌は 78 ± 44 pg/mL と無処理の 2.6% にまで低下した。したがって、MWCNT-7 は細胞に貪食されて IL-1 β 分泌を促進することが判明した。

一方、ナノクラス CNT (日機装 MWCNT) を処理した場合の IL-1 β 分泌は、 $6.6 \mu\text{g/mL}$ で MWCNT-7 による分泌の 13% 程度、また、SWCNT の場合には 11% 程度であった。また SWCNT では cytochalacin D の効果はほとんど認められなかった。顕微鏡で観察すると、SWCNT は分散しても細胞よりはるかに長い繊維状の塊のままであった。

さらに、フラーレン C60 が同様の効果を示すかどうかを検討した。MWCNT の場合と同濃度の PC/PG を用いたりポソーム中に、フラーレン C60 を分散し、細胞に添加した。フラーレン (6.6μ

g/mL) 処理細胞では、分泌される IL-1 β は MWCNT ($6.6 \mu\text{g/mL}$) 処理のわずか $1.4 \pm 0.2\%$ 、フラーレン ($20.0 \mu\text{g/mL}$) 処理細胞では $4.9 \pm 1.4\%$ に相当する量であった。

2. MWCNT によるマクロファージからのサイトカイン IL-1 β 分泌促進は caspase-1 阻害剤により抑制される

引き続き MWCNT-7 が THP-1 マクロファージから IL-1 β 分泌を促進する機構について、解析を行った。IL-1 β は caspase-1 が pro-IL-1 β を切断して産生されることが知られている。Caspase-1 阻害剤である zYVAD-fmk ($10 \mu\text{M}$) は $6.6 \mu\text{g/mL}$ の MWCNT-7 による IL-1 β 分泌を 2.1% にまで低下させた。したがって、MWCNT-7 は caspase-1 活性化を介して IL-1 β 分泌をもたらすことが判明した。

D. 考察

環境中ナノ粒子と心血管疾患との関係が示唆され、気管投与単層 CNT (SWCNT) による動脈硬化進展がモデルマウスで報告されたことから (Li Z et al, *Environ Health Perspect*, 2007)、本研究では MWCNT の影響を検証した。昨年度の研究において、アポ E KO マウスに MWCNT を 2 週間毎に 4 回、気管内投与し、8 週間後に大動脈弁ならびに大動脈内壁への脂質沈着を調べたところ、MWCNT 投与による影響は認められなかった。しかしながら、血中の抑制性サイトカイン IL-10 は有意に低下し、炎症性サイトカイン IL-1 β については上昇傾向が認められたことから、本年度は MWCNT による炎症反応の亢進に着目して検討を行った。

炎症は動脈硬化の修飾因子である。動脈硬化巣プラークの内皮が活性化して炎症反応が亢進すると、内皮に接着する単球細胞が増加し炎症が増悪する。NF- κ B は炎症反応において中心的な役割を持つ転写因子であり、p65 サブユニットは炎症性サイトカイン IL-1 β や IL-8、接着分子 ICAM

や VCAM の発現に関わる。大動脈内壁に接着する細胞の中で、p65-NF- κ B が染色される細胞の割合を調べたところ、MWCNT 気管内投与により増加傾向はみられたものの有意では無かった。今回の実験では、コントロール群でも 9 割の細胞が染色されて炎症が著しく亢進していたことから、MWCNT 処理による炎症亢進の可能性を観察するにはバックグラウンドが高すぎたと考えられる。

そこで *in vitro* の実験で、MWCNT が炎症反応を促進する可能性を検討した。ヒト単球由来細胞である THP-1 を PMA でマクロファージ様に分化し、培地に肺サーファクタントの脂質成分 PC/PG で分散した MWCNT-7 を添加したところ、IL-1 β の著しい分泌が観察された。細胞の食作用を cytochalacin D で阻害した場合には、分泌はほぼ抑制されたことから、MWCNT は細胞に貪食された後に、IL-1 β 分泌を促進することが判明した。

IL-1 β は caspase-1 により pro-IL-1 β が切断されて産生される。MWCNT による IL-1 β 分泌は caspase-1 阻害剤である zYVAD-fmk によりほぼ完全に抑制された。Caspase-1 はシグナルを受けて pro-caspase-1 から生じ、pro-IL-1 β を切断できるようになる。したがって、貪食された MWCNT は何らかのシグナルを発して pro-caspase-1 を活性化することが推定される。IL-1 β 産生シグナルの伝達には pro-caspase-1 を含むインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体が関与することが最近の研究から明らかにされている。MWCNT がどのような分子により認識されるか、あるいはどのようなシグナル伝達に関わるのか、今後、インフラマソームの構成成分を手がかりに解析を進める予定である。

MWCNT-7 は著しく IL-1 β 分泌を促進したが、同じく炭素原子からなるフラーレン(C60)は同濃度の MWCNT の 1.4% に相当する効果しか示さなかった。したがって、IL-1 β 分泌促進には MWCNT の形状が重要であることが示された。MWCNT であるナノクラス CNT ならびに

SWCNT (日機装) は MWCNT-7 に比べて 10% 程度の効果しか示さなかった。この二つの製品は、綿状の形状をとっていた。今回はポリトロンを用いて分散を行ったが、細胞よりはるかに大きな繊維状の塊までしか分散できておらず、細胞が貪食できなかった可能性が大きく、他の分散方法を試みる必要があると考えられる。

E. 結論

MWCNT が炎症を誘発する可能性について、気管内投与した動脈硬化モデルマウスの大動脈内壁での炎症制御因子 NF- κ B の発現には有意な差は認められなかった。ヒトマクロファージ系細胞においては、MWCNT は貪食されると IL-1 β 産生を著しく促進することが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1 Cui H, Okuhira K, Ohoka N, Naito M, Kagechika H, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. Tributyltin chloride induces ABCA1 expression and apolipoprotein A-I-mediated cellular cholesterol efflux by activating LXRalpha/RXR. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 819-824

2. 学会発表

1. Tomoko Nishimaki-Mogami: Regulation of human hepatic ABCA1 gene expression by sterols 第 42 回日本動脈硬化学会総会シンポジウム (2010.7)

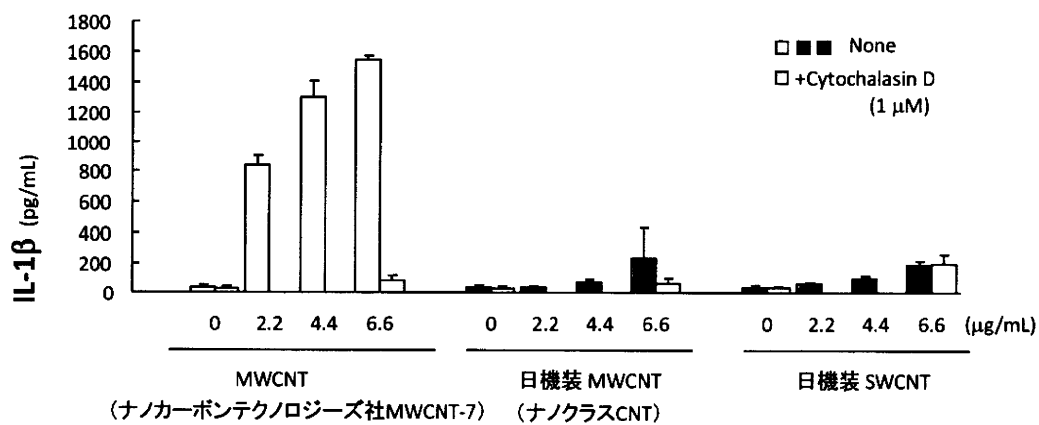


図1 MWCNTはTHP-1マクロファージからのIL-1β分泌を誘導する

研究課題名:ナノマテリアル健康影響評価手法の総合的開発
および体内動態を含む基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究課題名:炭素系ナノマテリアルの生体影響試験における物性測定に関する研究

分担研究者:宮澤 薫一 独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー基盤萌芽ラボ
フラーレン工学グループ グループリーダー

研究協力者:加藤 良栄 独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー基盤萌芽ラボ
フラーレン工学グループ NIMS 研究員

赤坂 夢 独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー基盤萌芽ラボ
フラーレン工学グループ NIMS 研究員

髙島 真一 独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー基盤萌芽ラボ
フラーレン工学グループ NIMS 研究員

研究要旨

C₆₀ フラーレンナノウイスカー(FNW)は、純粋に炭素のみからなる物質であるため、触媒金属を含むカーボンナノチューブとは異なって、カーボンナノファイバーの生体影響評価を行うためのモデル物質として適している。モデル物質として有用なものとなるためには、大きさ、形状、及び、機械的性質の制御が必要である。今回、溶媒組成を調製することにより、平均長さ 1.8 μm の短い FNW の合成に成功した。また、水が FNW の安定性に大きく影響することが明らかになり、FNW の生分解性を支持する結果を得た。さらに、FNW を難分解性とするを目的として高温真空熱処理を行った結果、FNW どうしの凝着が生じた。密度測定の結果より、熱処理によって C₆₀ ケージはほとんど破壊されることなく、C₆₀ ケージ間で炭素-炭素結合が生成して凝着が生じたと考えられる。

A. 研究目的

カーボンナノチューブ(CNT)は、テラパスカルオーダーの弾性率と 100 ギガパスカルオーダーの強度を持つ極めて優れた機械的性質を持つカーボンナノファイバーであることが知られている。筆者らは、かつて、アルミニウムと CNT とを複合させることにより、優れた機械的性質を持つ金属基炭素複合材料が開発できることを報告した[1]。その一方で、近年 CNT による中皮腫発生の恐れが報告され[2]、また、CNT が長さ依存した病理作用をもたらす恐れが報告されているように[3]、CNT の利用において、その生体影響評価の重要性が益々高まっている。

CNT の大量生産は、鉄などの金属触媒を用いた化学気相合成法(CVD)によって行われるため、CNT には触媒金属が残留している。CNT とアスベストは、ともに生分解性はなく、太さと長さにおいて類似しており、さらに、青石綿のように発がん性の高いアスベストには鉄が多く含まれていることより、CNT とアスベストには共通点が多く存在する。CNT の優れた性質の利用に対する期待は大きく、将来の CNT の大量使用を可能とするためには、CNT のリスクを十分に評価することが必要である。

一方、C₆₀ フラーレンナノウイスカー(FNW)は、C₆₀ 分子のみから成る純粋なカーボンナノファイバーで

あり、触媒金属を全く含まない特徴を持つ。FNWは、 C_{60} 分子がファン・デル・ワールズ結合によりゆるく結合してできているものであり、FNWのヤング率は、高々アルミニウムの値と同じ程度であって、CNTのヤング率の1/20程度と小さく軟らかい。

そのため、不純物金属を含まず軟らかいカーボンナノファイバーであるFNWは、CNTと異なる生体影響を持つと考えられる。そこで、本研究では、マイクロファージとの相互作用の検討に適した長さのFNWの合成法の開発を行った。また、FNWを難分解性とするための熱処理方法の研究を行った。

B. 研究方法

1. FNWの合成と安定性の評価

C_{60} 飽和トルエン溶液をガラスビンに入れ、イソプロピルアルコール(IPA)を静かに注いで液-液界面を形成後、一様な大きさの分布の種結晶を得ることを目的として、手振り混合を30回行った。このガラスビンをインキュベータ中に所定温度で保管し、FNWを成長させた。

水の影響を検討する場合は、IPA中に水を添加して、成長するFNWの様子を光学顕微鏡と走査電子顕微鏡(SEM)によって観察した。

2. FNWの熱処理

C_{60} 飽和トルエン溶液/IPAのLLIP法によって、FNWを合成し、それらを難分解性とするため、乾燥後、石英管に真空封入して900°Cで1時間焼成した。

3. FNWの断面構造解析

FNWをポリビニルアルコール中に包埋し、Gaイオンによる集束イオンビーム加工装置(FIB)によって、断面薄膜を作製し、この薄膜を透過電子顕微鏡(TEM)によって観察したデータについて、解析を行った。

C. 研究結果

1. FNWの合成と安定性の評価

図1は、0~3.8 mass%の水を含むIPAを用いて作製したFNWの合成開始から1日後の様子を示している。水の添加量が2.0 mass%までのIPAを用いた場合の C_{60} 結晶はウィスカ状であるが、2.3 mass%以上の水を添加したIPAを用いた場合は、粒子状の C_{60} 結晶が生成している。これは、過剰の水を添加した場合は、FNWの生成が阻害されるか、生成したとしても安定性が損なわれることを示している。図2は合成開始から7日後の様子を示している。

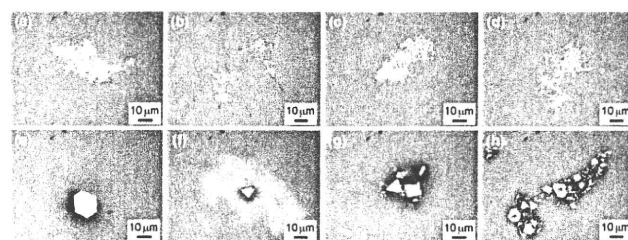


図1 (a) 0 mass% H_2O 、(b) 0.6 mass% H_2O 、(c) 1.3 mass% H_2O 、(d) 2.0 mass% H_2O 、(e) 2.3 mass% H_2O 、(f) 2.5 mass% H_2O 、(g) 2.8 mass% H_2O 、(h) 3.8 mass% H_2O の濃度のIPAを用いた場合の C_{60} 結晶の様子。合成開始から1日経過後の光学顕微鏡像

図1(d)では観察されなかった粒子状 C_{60} 結晶の生成が図2(d)で観察されている。このように、過剰な水はFNWの安定性を低下させることが分かる。

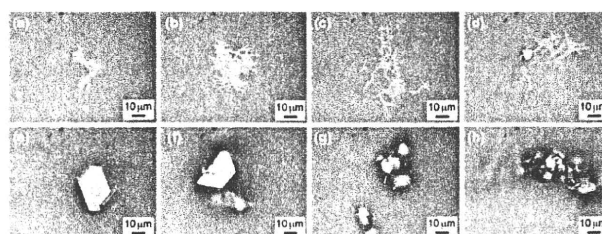


図2 (a) 0 mass% H_2O 、(b) 0.6 mass% H_2O 、(c) 1.3 mass% H_2O 、(d) 2.0 mass% H_2O 、(e) 2.3 mass% H_2O 、(f) 2.5 mass% H_2O 、(g) 2.8 mass% H_2O 、(h) 3.8 mass% H_2O の濃度のIPAを用いた場合の C_{60} 結晶の様子。合成開始から7日後の光学顕微鏡像

図3に、 C_{60} 飽和トルエン溶液と IPA を用いた LLIP 法によって、 15°C で作製した FNW の SEM 像を示す。体積比で、 C_{60} 飽和トルエン溶液:IPA=1:3 とした。SEM 像の解析から、図4に示すように、平均長さ $1.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$ 、平均直径 $387 \pm 131 \text{ nm}$ の短い FNW が合成されていることが分かった。アスペクト比は 3~10 の範囲に分布している。

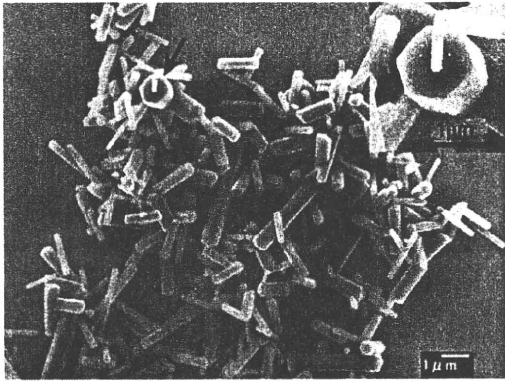


図3 LLIP 法によって合成した短い FNW の SEM 像 (挿入図は矢印部分の拡大図)

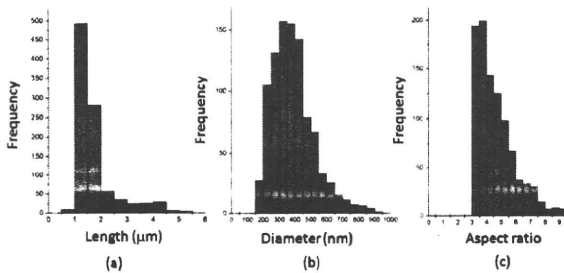


図4 図3の FNW の長さ、直径、アスペクト比の分布を示すヒストグラム

2. FNW の熱処理

上記の短い FNW を、 900°C で 1 時間熱処理した観察結果を図5に示す。

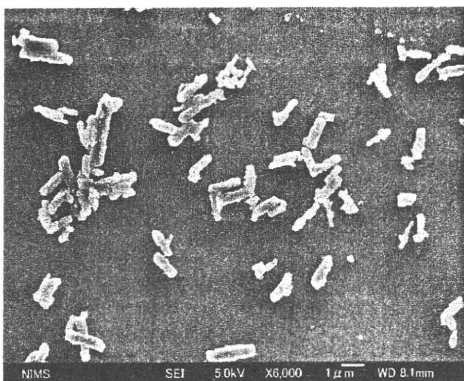


図5 図4の短い FNW を 900°C で 1 時間真空熱処理した場合の SEM 像

図5のように、FNW の表面は熱処理により荒れた構造となり、また、多くの FNW の間で凝着が生じていることが分かる。熱処理された FNW の平均長さは $1.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ となり、平均直径は、 $365 \pm 115 \text{ nm}$ となった。熱処理によって、長さは約 25% 減少し、直径は約 6% 減少した。形状分布を図6に示す。

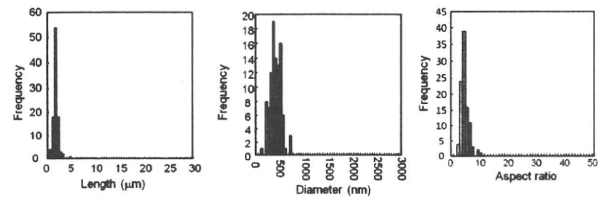


図6 短い FNW の熱処理後の分布。(a)長さ、(b)直径、(c)アスペクト比 (3.8 ± 1.4)

熱処理後の FNW の密度は、アルキメデス法によって 1.64 g/cm^3 と求められた。熱処理前の FNW (面心立方晶、格子定数 $a=1.417 \text{ nm}$) の X 線密度は 1.68 g/cm^3 であるので、熱処理によって、密度の減少がほとんどないことが分かる。

図7は、より長めの FNW の未熱処理材と熱処理材の SEM 像を示す。(b)の熱処理材で、矢印の部分で、収縮のために生じたと考えられるクラックが観察される。図8は未熱処理材の頻度分布を、図9は熱処理材の頻度分布を示す。

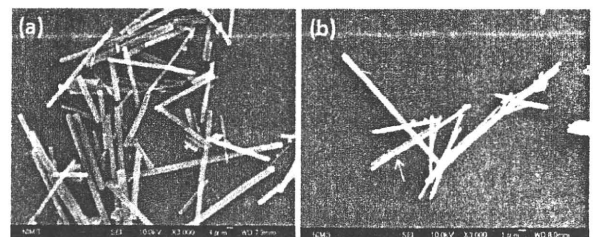


図7 (a)未熱処理材と(b) 900°C で 1 時間真空熱処理した FNW の SEM 像

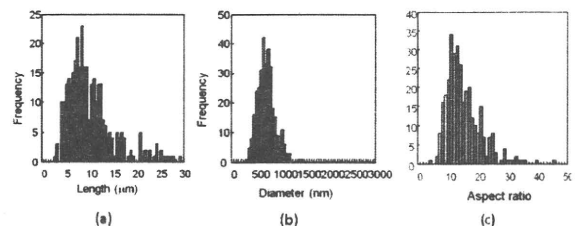


図8 未熱処理 FNW の(a)長さ($10.1 \pm 5.2 \mu\text{m}$)、(b)直径($686 \pm 171 \text{ nm}$)、(c)アスペクト比の分布

900°C の熱処理によって、FNW の長さは約25%減少し、直径は約15%減少した。短いFNWと長いFNWは、熱処理によって、ほとんど同じ長さの減少率を示しているのに対して、直径の減少率は、短いFNWのほうが長いFNWに比べて小さいことが分かる。

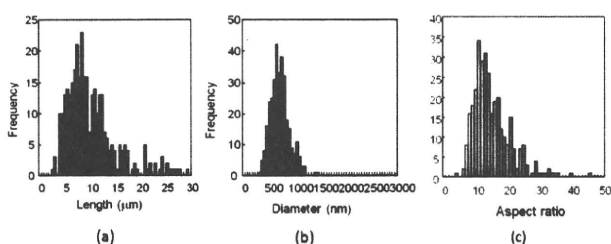


図9 900°Cで熱処理した FNW の(a)長さ($7.6 \pm 4.5 \mu\text{m}$)、(b)直径($586 \pm 232 \text{ nm}$)、(c)アスペクト比の分布

3. FNW の断面構造解析

図10に、収束イオンビーム加工装置(FIB)を用いて作製したFNW 断面薄膜の透過電子顕微鏡(TEM)像と、ポア(気孔)の半径方向分布の解析結果を示す。

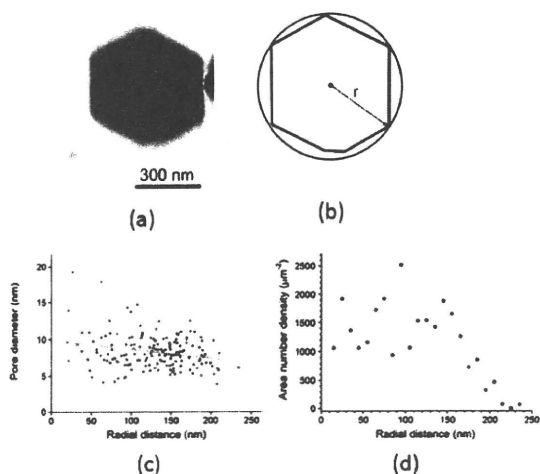


図10 FNW の(a)断面 TEM 像、(b)模式図、(c)ポアの直径の半径方向分布、(d)ポアの数密度(個数/面積(μm^2))の半径方向分布

D. 考察

FNW の安定性は、合成時における少量の水の添加によって大きく変化することが明らかになった。昨年度の研究において、マクロファージ様細胞によって FNW が分解することを示唆する結果を得ている[4]。これは、水環境中において、FNW が不安定化することが、生分解性を容易にしていると考えられる。

図10から、ポアの大きさは、4~20 nmの範囲であり、ポアが安定に存続できる臨界直径が約4nmであること、また、表面に近づくほど、ポアの数密度が小さくなり、FNWの内部が多孔質であり、表面層は緻密な構造となっていることが分かる。このコア-シェル構造が、FNWの機械的性質に大きく影響し、細くなるほど強度が高くなることが分かる。したがって、細長いFNWは、機械的強度が高くなり、有害性が増すと考えられるが、FNWが生体分解性であるために、長期における有害性は低下することが期待される。

難分解性物質とすることを目的として、900°Cの熱処理によるFNWの変性を試みた結果、密度は熱処理を施していないFNWとほぼ等しいことが分かった。一方、グラファイトの密度が 2.25 g/cm^3 であることを考慮すると、熱処理によって C_{60} のケージはほとんど分解することなく存在していると考えられる。

900°Cで真空熱処理したFNWは、水を良く吸着し、その比表面積は $155 \text{ m}^2/\text{g}$ であったのに対し、2500°Cで真空熱処理したFNWの水に対する比表面積は、大変小さく $2 \text{ m}^2/\text{g}$ であった[5]。2500°Cで熱処理したFNWは、疎水性のグラファイトリボンからなる非晶質炭素となっているため水に対する吸着能が低いのに対して、900°C熱処理材の高い吸着能は、 C_{60} ケージに、ほぼ水分子と同じ大きさを持つ孔が開いているためと考えら