

属について、元素分析を行った(表1)。MWCNT(WL)以外のCNTでPBSと比較して金属濃度が高くなっていることが示された。SWCNT(N)ではMg, TI, Mn, Fe, Rb、MWCNT(N)ではMg, Zn、MWCNT(WS)ではMg, Zn, Mn, Mo, Al、三ではV, Feの濃度が高かった。しかしながら、全般的

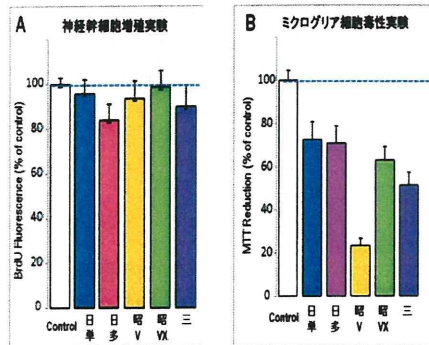


図1 各メーカーCNT超音波処理上清の神経幹細胞増殖(A)に及ぼす影響、およびマイクログリア細胞毒性(B)表1で作成したCNT超音波処理上清を10%の濃度で24時間細胞に添加した。神経幹細胞の増殖にどのCNT超音波処理上清も影響しなかったが、マイクログリアの細胞毒性はすべてのCNTで認められた。



図2 各メーカーCNT超音波処理上清:フィルターなし(A)および0.2 μmフィルター処理(B)超音波処理したCNTサンプルを0.2 μmのフィルターに通すと見た目はほぼ透明の溶液となった。アッセイにはそれぞれのサンプルの上清を用いている。

であることが明らかになった。特に、Feは昨年度の1/100の濃度であることが明らかになった(表右カラム)。

2. 神経幹細胞に対するCNT超音波処理上清の影響の検討

2-1 神経幹細胞増殖に対する影響

神経幹細胞増殖抑制作用はすべての超音波処理上清サンプルで認められなかった(図1A)。

2-2 ミクログリアに対するCNT超音波処理上清の影響の検討

金属の溶出量が少なかったにもかかわらず、すべてのCNT超音波処理上清はミクログリアに対して細胞毒性を示した。特に、どの金属種も低濃度を示したMWCNT(WL)に強いミクログリアの細胞毒性作用が認められた。

3 ミクログリアの細胞毒性とCNTの形状との関連

3-1 0.2 μmのフィルターに通したサンプルの作成

ミクログリアの細胞毒性に及ぼすCNT自身の形状の影響を検討するため、0.2 μmのフィルターを通したサンプルを作成した。CNT超音波処理上清をフィルターに通すことによって、見た目上CNT塊は全く見当たらず、透明のサンプルとなった(図2)。

3-2 CNT超音波上清、0.2 μmフィルター処理上清存在下でのミクログリアの形態の観察

CNT超音波処理上清、および0.2 μmのフィルターに通した上清サンプルでミクログリアを24時間処理したのち、顕微鏡下で観察した。黒いCNT塊をミクログリアが取り込み、除去しようとしている様子が確認できた。特に、MWCNT(WL)、MWCNT(WS)ではCNT塊にミクログリアが集まり、取り込もうとしている様子が観察できた(図3)。一方、0.2 μmのフィルターを通したサンプルでは、CNTを取り込んでいる様子や、ミクログリアが集積している様子は観察されなかった。

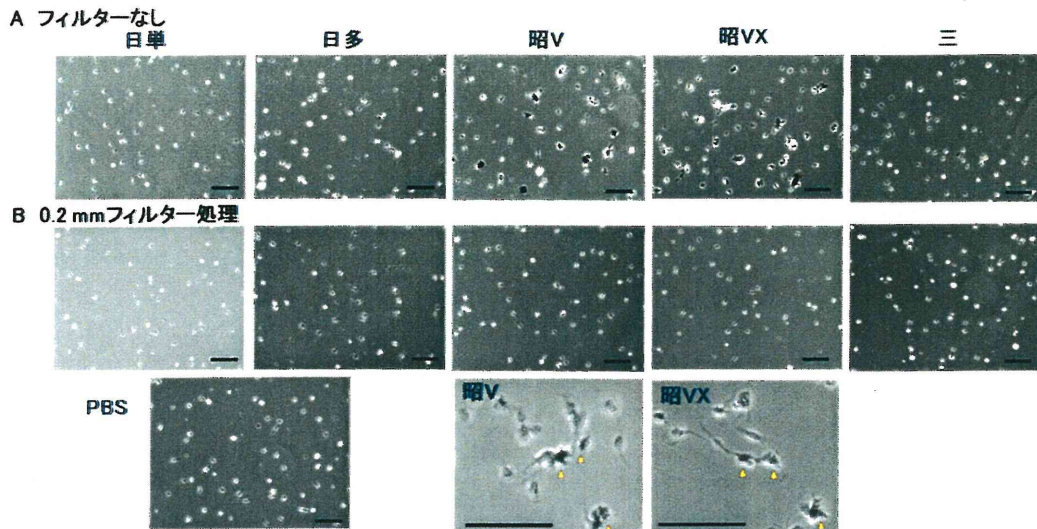


図3 各メーカーCNT超音波処理上清:フィルターなし(A)および0.2 μmフィルター処理(B)存在下におけるミクログリア細胞の位相差顕微鏡像
超音波処理したCNTサンプルをミクログリアに24時間処理したのち、顕微鏡下で観察した。フィルター処理していないCNTサンプルでは、CNT塊をミクログリアが取り込み除去しようと集めている様子が観察された。特に昭V、昭VXで顕著であった。Barの長さは100 μmを表す。

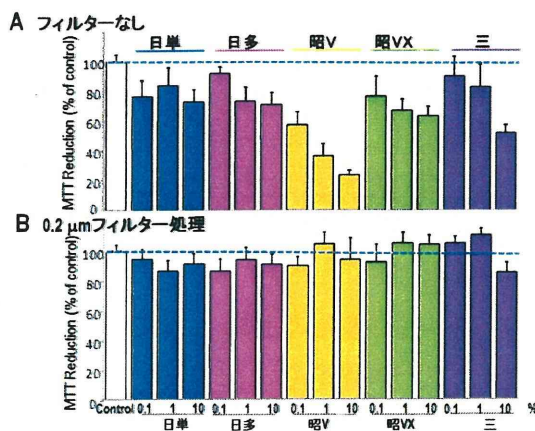


図4 各メーカーCNT超音波処理上清:フィルターなし(A)および0.2 μmフィルター処理(B)のミクログリア細胞毒性
図2のCNT超音波処理上清を0.1、1、10%の濃度で24時間、細胞に添加した。CNTによるミクログリアの細胞毒性は、0.2 μmのフィルターを通したCNTサンプルでは認められなかった。

3-3 ミクログリアに対するCNT超音波処理上清および0.2 μmのフィルターに通したサンプルの影響の検討

CNT超音波上清および0.2 μmのフィルター処理上清で (0.1、1、10%) ミクログリアを24時間処理し、MTTアッセイを行った。すべてのCNT超音波処理サンプルに

おいて、濃度依存的に認められるミクログリアの細胞毒性は、0.2 μmのフィルター処理したサンプルでは認められなかった。

4 ミクログリアからのNO産生に及ぼすCNT超音波処理上清の影響

活性化したミクログリアの機能の一つとして、

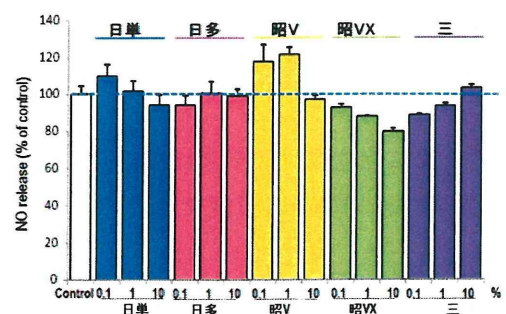


図5 各メーカーCNT超音波処理上清がミクログリアからのNO放出に及ぼす影響
CNT超音波処理上清(フィルターなし)を0.1、1、10%の濃度で24時間、細胞に添加した。ミクログリア培養上清中のNitrate濃度を測定した。すべてのCNTサンプルにおいて、特筆すべきNOの産生は確認できなかった。

NOの過剰な産生による神経細胞毒性があげられる。CNTを取り込むことにより、ミクログリアが活性化し、NOを産生して神経毒性を誘導する可能性を考え、CNT処理

ミクログリアからのNO産生を測定した。CNT超音波上清でミクログリアを24時間処置し、培養上清中に含まれるNitrateおよびNitrite量を定量した。すべてのCNT超音波処理上清で、NOの産生は確認できなかった。

D. 考察

CNT 超音波上清処置のメーカー間比較より、ミクログリア毒性にメーカー差があることがわかった。特に、W社MWCNT (WL)で強い細胞毒性を確認した。

金属濃度測定では、MWCNT (WL)以外のすべてのCNTで、PBS単独と比較して、Mg、Feなどの金属イオンが溶出していることが明らかになったが、前回に比べ溶出金属濃度が全般的に低いこと、特にFeに関しては1/100の濃度であることが明らかになった。CNTのロットは同じなため、サンプル内で、触媒金属量にムラがある可能性が考えられる。また、今回の金属溶出濃度ではCNTサンプルは神経幹細胞増殖に影響を与えないことも明らかになった。神経幹細胞の増殖抑制作用には、CNT自身というよりも、溶出した金属イオン、特にFeイオンが関与している可能性が示唆される。一方、ミクログリア細胞毒性の最も作用の強いMWCNT (WL)には、溶出量の高い金属がないことから、今回のミクログリア細胞毒性はCNT自身に由来した毒性である可能性が考えられる。実際、CNT超音波処理上清をミクログリアに作用すると、CNT細粒にミクログリアが集積する様子も観察される。ミクログリアの細胞毒性に及ぼす

CNTの形状の影響を検討するため、0.2 μm のフィルターを通し、 μm サイズ以上のCNT細粒を除去したサンプルでは、ミクログリアの集積は観察されず、細胞毒性も認められなかった。この結果は、ミクログリアの細胞毒性が、 μm サイズのCNT細粒が細胞内に取り込まれることによって、生じていることを示唆している。

一方、CNTサンプルはミクログリアからのNO産生を誘導しておらず、ミクログリアはCNT細粒を異物として認識し、貪食、除去するが、NOは産生することなく、周辺の神経細胞へNOによる毒性を誘発する可能性はないと考えられた。

E. 結論

CNTの超音波処理上清によるミクログリア細胞毒性に、 μm サイズのCNT細粒が重要であること、また、ミクログリアは μm サイズのCNT細粒を異物として認識し、細胞内に取り込んでいることが明らかになった。一方、CNTはミクログリアからのNOの産生には影響を与えなかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

○Sato, K., Kuriwaki J., Takahashi, K., Saito Y., Oka J., Otani Y., Sha Y., Nakazawa K., Sekino Y., Ohwada T.(2012) Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors. ACS Chem Neurosci 3, 105-113 (C.A.)

Takahashi, K., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K., Nakazawa, K., Sato, K. (2010). Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through different mechanisms. J Pharmacol Sci 112, 113-117. (C.A.)

佐藤 薫 (2011) グリア型グルタミン酸トランスポーター、日薬理誌 138:127

2. 学会発表

国内学会

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)
8. 藤森康希*1、高木淳平*1、佐藤薫、鈴木岳之*1 炎症時のグリア間コミュニケーションがグルタミン酸トランスポーター機能変化をもたらす 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (2011.8) (東京)
9. 佐藤 薫、高木淳平、藤森康希、鈴木岳之、関野祐子、パロキセチンは新規メカニズムにより炎症下のグルタミン酸取り込み機能低下を抑制する 第 34 回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
10. 鈴木岳之、高木淳平、藤森康希、佐藤 薫、炎症時グリア間コミュニケーションによりアストロサイトグルタミン酸トランスポーター機能低下が引き起こされる 第 34 回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
11. 最上(重本) 由香里、関野祐子、大野泰雄、佐藤 薫 生後ラットの脳・SVZ 周辺において活性化ミクログリアは神経およびグリア細胞の新生・分化を制御している 第 34 回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
12. 片山(小口) 敦子、門間彰彦、大友ゆき、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫、胎生期および新生期バルプロ酸暴露によるラット扁桃体遺伝子発現変動の網羅的解析 第 34 回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
13. 高橋由香里、永瀬将志、落合敏平、安井 豊、中尾彩乃、渡部文子、高木 聡、佐藤 優、奥津 浩也、守口 徹、佐藤 薫、加藤総夫 胎生～新生期における化学暴露が扁桃体神経興奮性に及ぼす影響の多面的評価法 第 34 回 日本神経科学大会 (2011.9) (横浜)
14. 中 誠則、真嶋悠幾、井手総一郎、佐藤 薫、南 雅文 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響 第 21 回 日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回 日本神経精神薬理学会 合同年会 (2011.9) (東京)
15. 真嶋悠幾、中 誠則、井手総一郎、佐藤 薫、南 雅文 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動

- に与える影響 第 62 回 日本薬理学会北部会 (2011.9) (仙台)
16. 佐藤 薫 iPS 細胞由来ニューロンの薬理的プロファイリング 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金医療品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」(2012.2) (東京)
 17. 佐藤 薫、最上由香里、関野祐子 創薬標的としてのミクログリアの新しい可能性 日本薬学会第 132 回年会シンポジウム「次世代創薬に向けた新たなストラテジー」(2012.3) (札幌)
 18. 高橋華奈子、最上(重本)由香里、岡田洋平、大津香苗、福角勇人、正札智子、金村米博、岡野栄之、関野祐子、佐藤 薫 ヒト iPS 由来神経細胞標本の薬効・毒性評価への応用可能性—最適 iPS 株探索と標準プロトコルの作成 日本薬学会第 132 回年会 (2012.3) (札幌)
 19. 最上(重本)由香里、藤森 康希、五十嵐 良明、広瀬 明彦、関野祐子、佐藤 薫 カーボンナノチューブが神経幹細胞に与える影響 日本薬学会第 132 回年会 (2012.3) (札幌)
 20. 片山敦子、門馬彰彦、大友ゆき、今井美鈴、秋友孝文、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫 胎生～新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索 日本薬学会第 132 回年会 (2012.3) (札幌)
 21. 藤森康希、高木淳平、佐藤 薫、鈴木岳志 炎症条件下グルタミン酸トランスポーター機能低下に対する抗うつ薬の作用 第 85 回日本薬理学会年会 (2012.3) (京都)
 22. 佐藤 薫、栗脇淳一、高橋華奈子、斉藤善郎、岡淳一郎、尾谷優子、沙宇、中澤憲一、関野祐子、大和田智彦 エストロゲン受容体を介さずグリア型グルタミン酸トランスポーターを抑制するタモキシフェン関連化合物の発見 第 85 回日本薬理学会年会 (2012.3) (京都)
- Y., Sekino, Y. Microglia instruct neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ (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促進する) ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting (2011.8-9), (Athens, Greece; アテネ市, ギリシャ国)
2. Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohno, Y., Sekino, Y. The role of activated microglia accumulated in the early postnatal SVZ (生後初期脳室下帯に集積しているミクログリアの役割) ISN Satellite meeting, Glial cells in (patho)physiology (2011.8), (Ljubljana, Slovenia; リュブリャナ市, スロベニア国)
 3. Sato, K., Takaki, J., Fujimori, K., Suzuki, T., Sekino, Y. Down-regulation of astrocyte L-glu transporters under inflammation is caused by glia-glia communication (炎症化のグルタミン酸トランスポーターの機能低下はグリア間コミュニケーションによって引き起こされる) SfN2011 (2011.11), (Washington D.C., USA; ワシントン D.C., アメリカ合衆国)
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

国際学会

1. Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohno,

平成 23 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

研究要旨

これまで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、マクロファージ細胞への影響について検討してきた。細胞障害の引き金となる機構にはCNTの形状を基とした直接的な生体膜への作用が関与すると考え、本年度はCNT暴露による細胞障害性に関して、特に生体膜に着目した検討を行った。すなわちCNTの生体膜への障害性を調べるために、卵黄ホスファチジルコリンで構成されたカルセイン封入リポソームを調製し、CNTと混合した際のカルセインのリポソームからの放出を測定した。その結果、CNTの暴露時間が長くなるとともにリポソームからのカルセインの放出が確認でき、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での暴露では、対照として用いたフラーレンC60と比較して有意な放出が確認された。以上の結果から、高濃度のCNT暴露により、細胞膜が障害され、細胞障害性を引き起こす可能性が示唆された。CNTによる脂質二分子膜の直接的傷害を示した研究であり、CNTの細胞障害機構の解明に貢献するものと確信している。

A. 研究目的

ナノマテリアル研究開発は、ライフサイエンス、情報通信、環境、エネルギーなどの分野における科学技術の進歩に貢献し、産業の振興やより豊かな暮らしを実現する技術として大変重要である。カーボン系ナノマテリアルとして、近年その有用性が期待されているのがカーボンナノチューブ（CNT）である。CNTは、1991年に日本で発見され、その様々なすぐれた性質から、現在盛んに研究が行われている。CNTは、軽量で伝導性や引っ張り強度に優れているため、エレクトロニクスや構造材料分野での応用が期待されている。さらに、近年、医療分野への応用も期待されており、特に Drug delivery system (DDS) 分野では、CNT

をドラッグキャリアとして利用する研究も進められている。

しかし、CNTの人体への影響に関しては未解明なことが多く、早急な解明が必要とされている。本研究ではCNTの生体への影響とその機構解明を試みた。これまでに3

種類のCNT、すなわちVCGF多層CNT（MWCNT）、単層CNT（SWCNT）、30ナノクラス多層CNT（30nc）に関して、マクロファージ細胞に対する障害性、サイトカイン産生への影響などについて検討してきた。

本年度はもっとも分散性に優れたVCGF多層CNT（MWCNT；150 nm in diameter, 8

μm length)を用い、特に膜傷害性に焦点を当てて、CNT 細胞障害機構の解明を目的とした検討を行った。すなわち CNT は繊維状の構造をしていることから、細胞膜を穿通するのではないかと考え、CNT 暴露を行った細胞の顕微鏡観察を行った。続いて、CNT 暴露により、細胞から漏出する乳酸脱水素酵素 (LDH) の定量を行った。さらに、膜傷害に関する知見を固めるため、リポソームを細胞膜に見立て、膜傷害性の検討を行った。すなわち、卵黄フォスファチジルコリン (EggPC) を構成脂質とするリポソームに蛍光試薬であるカルセインを封入し、CNT 暴露によるカルセインの漏出を確認した。

B. 研究方法

1. MWCNT 懸濁液の調製

VCGF-MWCNT (以下 CNT) を PBS に懸濁し、プローブ型ソニケーターで超音波処理を行った。対象としたフラーレンについては Fullerene- C_{60} 懸濁液を PBS 中で調製し、プローブ型ソニケーターで氷冷下超音波処理を行った。

2. RAW264 細胞に対する CNT の作用

マウスマクロファージ由来 RAW264 細胞は、DMEM-HG に Penicillin G (Final conc. 100 units/mL)、Streptomycin (Final conc. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および FBS (56°C で 30 分間非働化処理、Final conc. 10%) を添加した培地中で、5% CO_2 存在下、37°C で培養した。コンフルエント時には 0.025% Trypsin / EDTA / PBS 溶液を用いて細胞を剥離し、継代を行った。

細胞障害性については、細胞を 24 時間 CNT 暴露後に、生細胞を WST-8 法により検出した。顕微鏡観察については、RAW264 細胞を 1.0×10^4 cells/well となるように Lab-Tek II チャンバースライド (8 穴、Electron Microscopy Sciences) に播種し、10% FBS 含有 DMEM-HG 中で 5% CO_2 存在下、37°C で一晩インキュベートした。細胞を洗

浄後、CNT/PBS および Fullerene- C_{60} /PBS を最終濃度が 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、5% CO_2 存在下、37°C で 3 時間インキュベートした。培養上清を除去し、細胞を PBS で洗浄後、4% Paraformaldehyde/Phosphate buffer solution を加えて 4°C で一晩静置した。上清を除去し、細胞を洗浄後、Mountant, Permafluor (Thermo Scientific) を加えてマウントした。共焦点レーザー顕微鏡により細胞の観察を行った。

3. CNT 暴露による活性酸素の産生

RAW264 細胞懸濁液 (10% FBS-DMEM- HG) を 96 穴プレート (FALCON) に 1×10^5 cells/well となるように播種し、一晩培養した。5 μM CM- H_2DCFCA を加え 37 °C で 30 分間培養した。その後 CNT (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え 37 °C で 30 分間培養し、ROS 産生を蛍光 (Ex 492 nm, Em 527 nm) により測定した。

4. 細胞からの LDH 漏出測定

RAW264 細胞懸濁液 (10% FBS-DMEM- HG) を 96 穴プレート (FALCON) 1×10^4 cells/well となるように播種し、一晩培養した。細胞を PBS で洗浄後、CNT 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように PBS、PBS の 2 倍希釈液、または 4 倍にて希釈し 37°C にて培養した。各時間において 10 秒間軽く攪拌後 (NS-4P、アズワン)、培養上清を 1.5 mL チューブに分取し、遠心 (100 x g, 5 min, 4°C, CF15RXII、HITACHI) した。上清 50 μL を LDH-細胞毒性テストワコー付属の 96 穴プレート (NUNC) に分取した。発色試薬を加え、ボルテックスにて攪拌した後、50 μL を 96 穴プレートに添加し、30 秒間攪拌後、1 時間室温にて遮光下インキュベートした。精製水にて 2 倍希釈した反応停止液 100 μL を加え、1 分間攪拌した後、マルチプレートリーダー (Infinite M200, TECAN) で 570 nm における吸光度を測定した。

5. カルセイン内封リポソームの調製

リポソーム調製に先立ち、カルセイン溶液 (Calcein 100 mM, MOPS, 10 mM, pH 7.0) を調整した。クロロホルムに溶解した EggPC をナス型フラスコに分取し、適量のクロロホルムと混合した。ロータリーエバポレーターで減圧下クロロホルムを留去し、1 時間以上真空ポンプにて減圧乾固した。60°C 条件下で EggPC 最終濃度 40 mM となるように 100 mM Calcein / MOPS buffer を加えて水和後、液体窒素を用いて凍結融解を 3 回行った。バス型ソニケーターで 10 分間処置後、60°C に加温した Extruder (Lipex Biomembranes, Inc.) を用い、400 nm 孔径のポリカーボネート膜 (Nucleopore Track-Tech Membrane, Whatman Ltd.) に通すことによりサイズを調整した。続いて、超遠心 (432,000 x g, 15 min, 4°C, himac CS120GXL) を 3 回行い、最終的に PBS に再懸濁した。得られたリポソーム溶液の粒子径は Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd.) で測定した結果、約 540 nm であった。

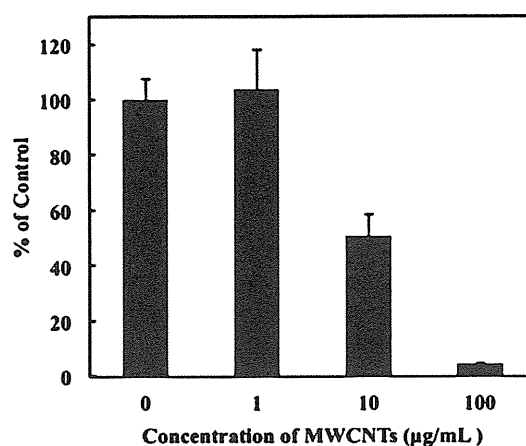
6. リポソームを用いた CNT 暴露による細胞膜障害性の検討

調製したカルセイン内封リポソームを PBS で 1000 倍希釈し、96 穴プレート (Black, FALCON) に 100 μ L/well 加えた。続いて、2, 20, 200 μ g/mL となるように PBS で分散した VCGF 多層 CNT および Fullerene-C₆₀ を 100 μ L を加えた (最終濃度 1, 10, 100 μ g/mL)。またネガティブコントロールとして PBS 100 μ L を加えたもの、さらにポジティブコントロールとして各濃度の CNT および Fullerene-C₆₀ に最終濃度 1% (w/v) オクチルグルコシド/1 mM EDTA を 100 μ L 加えた。37°C で振とうインキュベーター (500

rpm, Thermomixer comfort, Eppendorf) した後、各時間における蛍光強度 (Ex. 490 nm, Em. 520 nm) をマルチプレートリーダー (Infinite M200, Tecan) で測定した。

C. 研究結果

1. CNT による RAW264 細胞障害性の検討 マウスマクロファージ由来 RAW264 細胞



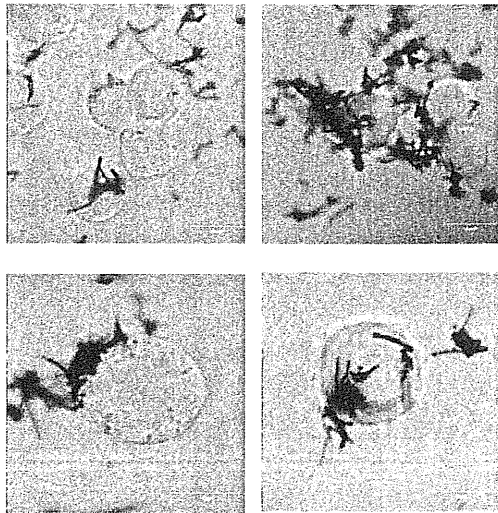
に対する CNT の障害性を図 1 に示す。CNT は 10 μ g/mL 以上の濃度で細胞障害性を示したが、1 μ g/mL では細胞障害性は示さなかった。

図 1 : Cytotoxicity of MWCNTs against RAW264 cells.

RAW264 cells were seeded on a 96-well plate and cultured overnight. MWCNTs (1, 10, or 100 μ g/mL) were added and incubated for 3 h at 37°C. Then, TetraColor One solution was added to each well and the absorbance at 450 nm was measured.

細胞障害性誘発の原因として、直接的な作用が引き金となっている可能性がある。そこで、CNT の細胞に対する作用を共焦点

CNT (10 $\mu\text{g/mL}$) CNT (100 $\mu\text{g/mL}$)



Scale bars: 10 μm

図 2 : Interaction of MWCNTs with RAW264 cells.

RAW264 cells were incubated with MWCNTs (100 $\mu\text{g/mL}$) for 3 h at 37°C. After fixing the cells with 4% paraformaldehyde, the distribution of MWCNTs was observed under a differential interference contrast microscope. Scale bars indicated 10 μm .

レーザー顕微鏡により観察した (図 2)。その結果、CNT の多くが細胞膜に存在しており、一部は膜に刺さっているような様子が観察された。このことから、CNT は細胞膜を物理的に傷害し、細胞生存に影響を与えている可能性が示唆された。また、CNT 暴露 3 時間後の観察であることから、CNT は暴露後早期に細胞膜に作用することが示唆された。

2. CNT による RAW264 細胞における活性酸素の誘導

CNT による RAW264 細胞における活性酸素の誘導は、ROS により蛍光を発する H2DCFDA を用いて測定した。測定に先立ち H2DCFDA の triCM 体を用いて細胞内に導入した。結果は図 3 に示すように、細胞障害が見られる 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度の CNT により、ROS 産

生が明らかとなった。

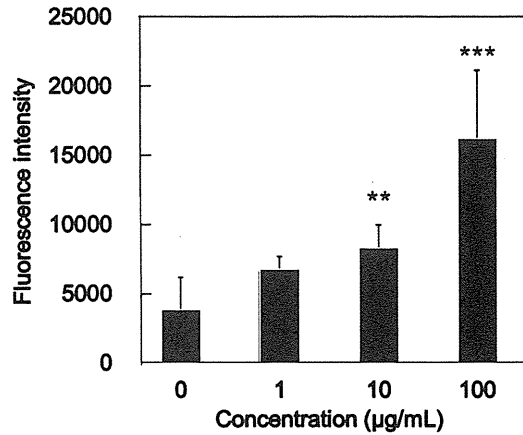


図 3 : Production of ROS in RAW264 cells by the exposure to MWCNTs

3. CNT 暴露による細胞膜傷害性の検討

先の共焦点レーザー顕微鏡観察から CNT が細胞膜に直接作用している様子が観察されたため、次に CNT が細胞膜傷害を起こしているかどうかを調べた。細胞の直接的傷害により細胞内の高分子が漏出することになる。そこで CNT を暴露した細胞から遊離する乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定した。

生体膜に CNT が直接作用しても、膜のバ

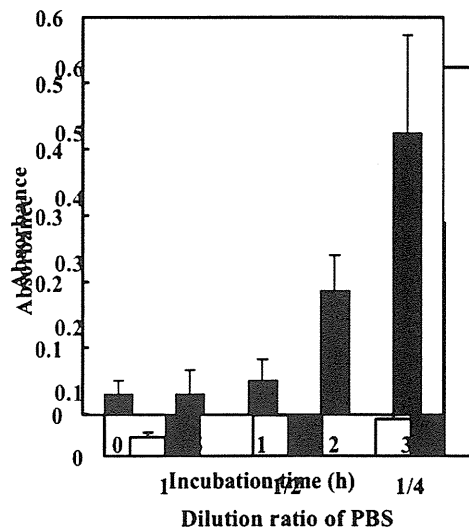


図4 : LDH release by exposure to MWCNTs in RAW264 cells.

RAW264 cells were incubated with MWCNTs (100 $\mu\text{g/mL}$) suspended by forth-diluted PBS for 0.5, 1, 2, or 3 h (upper), or suspended by PBS with indicated dilution for 3 h (lower). After the cell culture supernatant was centrifuged, the amount of LDH in the supernatant was determined by measuring the absorbance at 450 nm after LDH cytotoxicity test reagent.

ータベーションが十分に大きくなければ必ずしもタンパク質等の高分子の流出には至らない。しかしながら浸透圧に対しては脆弱となることが予想される。そこでパータベーションを可視化するために、細胞外相の浸透圧を1/2あるいは1/4に低下させた。図4上に示すように浸透圧を下げることでより明らかなLDHの流出が見られた。またこの条件では図4下に示すように時間とともに細胞障害性が増大した。

4. CNT 暴露による脂質二分子膜傷害

本研究ではCNTによる細胞障害の引き金としてCNTの形状から直接的に生体膜に作用し、これが直接、あるいは間接的に細胞障害を誘発するという仮説を立てて研究を遂行してきた。この直接的な照明のためには脂質二分子膜からなるリポソームをCNTが直接的に傷害するかどうかを鍵となる。蛍光物質カルセインは高濃度では消光する特徴を有するため、高濃度のカルセインを封入したリポソームを調製し、リポソーム膜の傷害により漏出したカルセインの蛍光強度を膜傷害の指標として検討した。

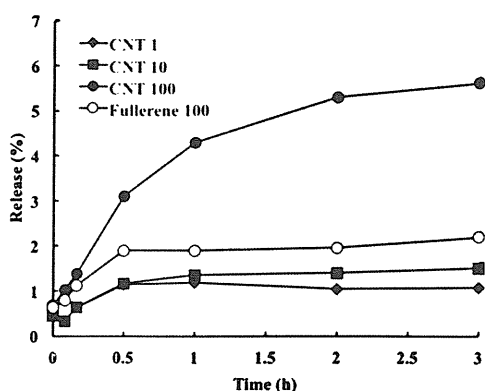


図5 : Liposome membrane damages by exposure to MWCNTs.

Calcein-encapsulated liposomes were mixed with the suspension of MWCNTs (1, 10 or 100 $\mu\text{g/mL}$) or Fullerene C_{60} (100 $\mu\text{g/mL}$) and shaken at 37°C. The fluorescence intensity of calcein released into the supernatant was measure at indicated time. Significant differences were shown with asterisks (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$).

CNT (1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$) および Fullerene- C_{60} (100 $\mu\text{g/mL}$) をカルセイン封入リポソームに処理した際のカルセインの漏出について検討した結果、CNT 100 $\mu\text{g/mL}$ では、インキュベーション時間とともにリポソームからのカルセインの漏出が確認され、脂質二分子膜の傷害が明らかとなった。一方、同濃度の Fullerene- C_{60} ではそのような漏出は見られなかった。

D. 考察

CNT は、優れた性質をもつことから、現在盛んに研究が行われているナノマテリアルである。軽量かつ非常に高い強度を持ち、熱伝導性や電気伝導性、耐熱性にも優れていることから、現在、半導体や燃料電池など、様々な用途が期待されている。ナノテクノロジー技術の進歩に伴い、CNT の利用はますます増えると推測できる。

一方で、CNT が発見された当初から、安全性についての懸念もあった。これまでに、ナノマテリアルによる有害事象としてよく知られているのが、アスベストによる中皮腫形成である。アスベストは耐久性や断熱性に優れているため、構造材料として広く使用されてきた。しかし、アスベストを取り扱った作業従事者の多くに、中皮腫形成などの健康被害が見られた。後の研究で、アスベストは繊維状の構造をもつことから、吸入により肺に到達すると、肺胞組織に突き刺さり、肺がんや悪性中皮腫を起こすことが示唆されている。

現在、CNT による人的被害はまだ報告さ

れていない。しかし、CNT はアスベストに似た繊維状構造をしていることから、アスベストと同様の健康被害が懸念されている。長繊維状の CNT をマウスに腹腔投与した結果、同様の長さのアスベスト投与と同様の作用を示すことも報告されている。

本研究では、CNT がそのファイバー状の形状ゆえに、直接的に生体膜に作用するという作業仮説を立てて実験に臨んだ。実際に共焦点レーザー顕微鏡観察から CNT 暴露により、CNT が膜に直接作用している可能性が示唆された。そこで CNT 暴露により細胞から遊離した LDH の活性を測定した。LDH は細胞質に存在する酵素で、細胞膜破壊により細胞から遊離することから、細胞膜傷害の指標となる。ただし CNT が生体膜と作用しても、これが直接膜傷害を起こすかどうかは不明であった。そこで膜に作用し膜をパーターブするだけでも障害として測定できるように、細胞外の浸透圧を下げる試みを行った。その結果、CNT 暴露開始から 1 および 3 時間後において、低濃度の CNT と比べて、CNT 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の暴露で有意に LDH の漏出が見られ、高濃度の CNT では、暴露早期から細胞膜へ作用することが示唆された。また、漏出した LDH の絶対量が少ないことから、CNT は細胞を破壊したわけではなく、細胞膜にわずかな傷害を与えたと考えられる。

リポソーム脂質膜に対する傷害性の検討では、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CNT において、継時的に細胞からカルセインの漏出が起こったことから、CNT がリポソーム脂質膜を傷害していることが示された。一方、同濃度の Fullerene- C_{60} ではそのような傾向は見られなかった。これは、CNT が繊維状の構造をとるのに対して、Fullerene- C_{60} は球状の構造をとるからであろうと考えられる。したがって CNT による膜傷害性はその構造に由来し、細胞膜に物理的に作用すると考えられる。実際には CNT が細胞膜へ作用する、あるいはエンドサイトーシスの後にオルガネラ膜に作用し、間接的に活性酸素の産生

等を誘発し細胞障害を起こす可能性を考えている。この裏付けとして、実際に ROS 産生が RAW264 細胞で見られた。本研究の成果は CNT の細胞障害機構の解明に貢献すると考えている。またリポソームの系はきわめて簡易で再現性に富んでいるため、CNT の細胞障害の指標として使える可能性も十分にあると考えている。

E. 結論

本研究では、CNT の生体に与える影響について、CNT の細胞膜傷害性に着目して検討した。CNT を 3 時間暴露した細胞の CNT 分布を観察したところ、CNT が膜に直接作用している様子が観察された。また、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CNT を 1 および 3 時間暴露した細胞では、低張条件下ではあるが LDH の漏出が確認され、CNT が細胞膜を物理的に傷害している可能性が示唆された。さらに、CNT の膜に対する作用を調べるため、生体膜モデルであるリポソームを用いた新たな評価を試みた。その結果、同濃度の Fullerene- C_{60} と比べ、CNT 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は有意に脂質二分子膜傷害性を示した。これは CNT は繊維状の構造をしているために、細胞膜に物理的に作用し、膜傷害を引き起こしたと考えられる。

以上の結果より、高濃度の CNT は、膜作用が引き金となって、細胞障害を引き起こすことが示唆された。実際に CNT が細胞膜に作用し、活性酸素産生を誘起する、あるいは細胞に取り込まれた後、細胞小器官の膜を傷害し活性酸素産生を誘起する可能性が考えられる。膜傷害性、活性酸素産生、細胞毒性の因果関係については興味を持たれるところである。

本研究で、CNT が生体に有害である可能性が示唆された。しかし、優れた性質を有する素材であるため、CNT を安全に利用し、社会の発展に寄与することが望まれる。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

【学会発表】清水広介、内山安里奈、西村哲治、広瀬明彦、奥 直人. カーボンナノチューブ暴露による生体膜障害性の検討. 日本薬学会第132年会 (2012年3月、札幌)

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。

平成 23 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）

分担研究報告書

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：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の一環として、多層 CNT (MWCNT) がマクロファージにおいて炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を促進する機序を解析した。MWCNT を暴露すると caspase-1 が切断活性化されて活性型 IL-1 β の産生が増加した。高濃度 K⁺による抑制から、MWCNT によるシグナルの受容には NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3)を含むインフラマソームの関与が示唆された。そこで NLRP3 を siRNA でノックダウンしたところ、MWCNT による IL-1 β 産生は強く抑制された。NLRP3 は内外の危険因子により活性化され、様々な病態に関わることが知られており、MWCNT の炎症性病態との関連が示唆される。

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。

疫学的・実験的な研究から、心血管疾患

は環境中ナノ粒子 PM0.1 (<100 nm) と相関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。そこで本研究では多層 CNT (MWCNT) の作用を検討したところ、SWCNT の動脈硬化促進作用は再現されなかった。また、大動脈内壁での炎症因子の発現には変化がなかった。しかしながら血中の炎症性サイトカイン IL-1 β の増加傾向が認められたことから、in vitro での検討を行い、マクロファージに MWCNT を暴露すると IL-1 β の産生が亢進すること

を示した。本年度はその機序について、IL-1 β の産生を制御する Nod 様受容体に着目して関与を検討した。

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ズ社) を用いた。Phosphatidylcholine (PC) は Avanti 社 (卵由来、#840051P)、phosphatidyl-glycerol (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ミリポア社の MILLIPLEXTMMAP アッセイキットを用いた。StealthTM Select RNAi (NLRP3) および Stealth RNAi negative control は Invitrogen 社から購入した。

2. MWCNT 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。

3. マクロファージ系細胞からの IL-1 β

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、0.3 μ M PMA と 10%FCS を含む RPMI 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、あるいは対照となる溶剤 (PC/PG 溶液) を培地に添加し 6 時間培養した。培養上清を回収後、Bio-Plex Suspension Array System あるいは MILLIPLEXTMMAP アッセイを用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

4. RNA 抽出および定量的リアルタイム RT-PCR

細胞から RNA は RNeasy Mini Kit を用いて抽出し DNase 処理を行った。TaqMan one-step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems) と ABI Prism 7300 を用いて定量的リアルタイム RT-PCR を行った。発現量データは 18S rRNA の量で補正した。

5. ウェスタンブロット

細胞はプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む RIPA 緩衝液で可溶化した。培地はマイクロコン YM-10 (アミコン社) を用いて濃縮したのち、SDS-Page でタンパクを分離し、Immobilion-P 膜 (ミリポア社) に転写した。抗 IL-1 β および抗 caspase-1 抗体 (Santa Cruse 社)、抗 β アクチン抗体 (Sigma 社) を一次抗体として使用し、ECL キット (GE 社) で発光により目的タンパクを検出し、LAS-3000 イメージアナライザーで定量した。

C. 研究結果

1. MWCNT 暴露マクロファージにおける活性型 IL-1 β と活性型 caspase-1 産生の促進

昨年度の研究で、MWCNT (MWCNT-7) を肺サーファクタント脂質成分である PC/PG で分散して THP-1 マクロファージに暴露すると、培地への IL-1 β 分泌が著しく亢進することを見いだした。

本年度はウェスタンブロットで分析を行い、2.2~20 μ g/mL の MWCNT を暴露した細胞の培地中には、濃度に応じて活性型の IL-1 β (p17) が増加していることを確認した。IL-1 β は caspase-1 が pro-IL-1 β を切断して産生する。Caspase-1 はインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体の中でシグナルを受けて自己切断され、活性型の caspase-1 (p10) が生成することが知られている。MWCNT の濃度増加に伴い、培地中の活性型 IL-1 β (p17) と caspase-1 (p10) がともに増加することを確認した。

2. MWCNT による IL-1 β 産生への NLRP3 の関与

Nod 様受容体の一つ NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) を含むインフラマソームは活性化に細胞からの K⁺流出が必要とされ、培地に高濃度 (130mM) の KCl を添加すると、K⁺流出が阻害されることが知られる。MWCNT による IL-1 β 分泌は KCl 添加によりほぼ完全に阻害されたことから、NLRP3 の関与が推定された。そこで NLRP3 が関与するかどうか、siRNA を用いて NLRP3 をノックダウンし検証した。三種類の NLRP3 siRNA (#1, #2, #3) はどれも細胞の NLRP3 mRNA の発現量を negative control siRNA (GC high) に比較してそれぞれ 40 \pm 2%、35 \pm 0.4%、45 \pm 2% にまで低下させた。また MWCNT (6.6 μ g/mL) による IL-1 β 分泌はそ

れぞれ対象の 14.5 \pm 0.4%、12.3 \pm 0.5%、9.1 \pm 2.3% にまで低下した。培地に分泌される活性型 IL-1 β (p17) および caspase-1 (p10) の量も、NLRP3 に対する siRNA (#1~#3) により、著しく低下した。Caspase-1 は一部の合成 RNA やウイルス RNA によっても活性化されて IL-1 β 産生が促進されることから、negative control siRNA 自体が IL-1 β 分泌を促進する作用がないことを GC 含量が異なる三種類の control siRNA について確認した。したがって、MWCNT が引き起こす IL-1 β 分泌には NLRP3 が関与することが結論づけられた。

D. 考察

昨年度までの研究において、気管投与 MWCNT による動脈硬化進展作用を調べたところ、SWCNT による報告は再現されなかった。しかしながら、血中の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 in vitro での検証を行い、MWCNT がマクロファージに貪食されると IL-1 β 産生を促進することを確認した。

本年度はそのメカニズムの解明を試みた。IL-1 β は caspase-1 により pro-IL-1 β が切断されて産生される。Caspase-1 はシグナルを受けて pro-caspase-1 から自己切断されて生じ、pro-IL-1 β を切断できるようになる。MWCNT を処理した細胞では、切断産物である活性型の IL-1 β (p17) と caspase-1(p10) の分泌がともに促進されていた。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。そこで IL-1 β 産生シグナルの受容に関わる因子の候補として、Nod 様受容体 NLRP3 に着目して関与を検討した。NLRP3 は活性化に K⁺ 流出が必要とされる。MWCNT による IL-1 β 産生は、高濃度の K⁺ 添加により阻害されたことから、NLRP3 の関与が強く示唆された。さらに細胞の NLRP3 を特異的 siRNA を用いてノックダウンすると、MWCNT による IL-1 β 産生は大きく低下したことから、MWCNT シグナルの受容と caspase-1 の活性化には NLRP3 を含むインフラマソームが関与することが示された。

最近の研究から、NLRP3 が内外の danger signal を認識して炎症を誘導する役割を持つことが明らかにされている。NLRP3 はバクテリアトキシンやアスベストシリカなど外因性の固形異物、さらには尿酸やコレステロールなどの内因性の微細結晶、 β アミロイド貪食など様々な要因により活性化され、炎症応答を介して痛風や動脈硬化、2 型糖尿病などの病態進展と深く関わるということが明らかにされている。炎症は免疫応答を誘導して病原体を排除する生体防御反応である。しかし排除に失敗し炎症反応が遷延化した慢性炎症は、動脈硬化など生活習慣病、肝炎やピロリ菌によるガンなど多様な疾患に関わる要因となる可能性が提唱されている。本研究により、MWCNT が NLRP3

の活性化を介して炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を促進する機構が明らかにされた。MWCNT が組織から排除されずに停留するならば、炎症反応が長期に持続し、動脈硬化やガンなど様々な病態に関わる可能性が考えられる。

E. 結論

MWCNT をマクロファージに暴露すると炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を促進する。貪食された MWCNT は NLRP3 を含むインフラマソームを介して caspase-1 を活性化し、活性型 IL-1 β の産生を促進する機構を明らかにした。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. 最上（西巻）知子, 崔 紅艶, 岩崎 香里, 奥平 桂一郎, 内藤 幹彦, 鈴木 和博, 広瀬 明彦 多層カーボンナノチューブは NLRP3 活性化を介して IL-1 β 産生を促進する 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7) (横浜)
2. 最上（西巻）知子, 崔 紅艶, 岩崎 香里, 奥平 桂一郎, 内藤 幹彦, 鈴木 和博, 広瀬 明彦 多層カーボンナノチューブによる IL-1 β 産生促進とその機構 フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011.10)

平成 23 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）
分担研究報告書

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 先端材料プロセスユ
ニット

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 先端材料プロセスユ
ニット

フラーレン工学グループ 研究業務員

研究要旨

C₆₀ フラーレンナノウィスカー(FNW)は、純粋に炭素のみから構成される繊維状物質であるため、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。前年度までの研究で、ファン・デル・ワールス力により結合した C₆₀ 分子から構成される FNW は生体中で不安定であり、分解を示唆する結果を得た。そこで、C₆₀ 分子どうしをレーザーによって重合させ、難分解性のものとする研究を行うこととし、そのための基礎実験として、ラマン装置によって、レーザー光照射量と FNW の重合化度との相関を明らかにすることを目的とした。その結果、波長 532 nm の緑色レーザー光を用いて大気中で照射した場合は、1520 J/mm² 以上の線量が、FNW の完全な重合化に必要であることが明らかになった。

A. 研究目的

C₆₀ 分子から構成される針状結晶である C₆₀ フラーレンナノウィスカー (FNW) は、C₆₀ の良溶媒飽和溶液に C₆₀ の貧溶媒を重層させて液-液界面を形成し、その後の拡散による両溶媒の混合と均一化の過程における結晶核の生成と成長によって容易に合成することができる[1]。FNW は純粋に炭素のみからなる針状結晶であり、その直径は、100 nm 前後から数 100 nm と細いファイバ

ー形状を有している。一方、機械的な強度の指標となるヤング率は、van der Waals 結合のみからなる C₆₀ 結晶の場合は

約 20 GPa であるのに対して[3]、電子線照射した場合は、32~69 GPa と高い値を示す[4、5]。また、FNW は細くなるほど高いヤング率を示す[5]。このことは、ファイバー形状を持つ物質は、一般に、細くなるほどより剛性が強まることを示唆しており、究極の

ナノファイバーである多層カーボンナノチューブのヤング率がテラパスカルオーダーの高い値となることも矛盾しない[6]。

前年度では、FNW を難分解性とするために、FNW の高温熱処理により非晶質カーボンナノファイバーを合成することを試みたが、焼成による FNW の凝着が発生したため、熱処理による難分解性の付与は困難であることが分かった。そこで、今後は、レーザー照射によって、 C_{60} 分子どうしを共有結合により重合することにより、機械的強度の高い FNW の合成研究を進めることとし、まず、レーザーによる重合条件の探索研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. FNW サンプルの調整

C_{60} 飽和トルエン溶液を透明ガラスビンに入れ、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、約 10 秒間超音波照射して強制拡散させた後、24 時間 10°C でインキュベータ中に保管した。このガラスビン中に生じた FNW を濾別後、 100°C で 2 時間乾燥し、ラマンレーザー照射用のサンプルとした。

2. ラマン分光装置による FNW へのレーザー光照射

本実験で用いたラマン分光装置(JASCO NRS3100)は、励起光 532nm の緑色レーザー光源を持つ。このレーザー光を FNW サンプル上に対物レンズを介して集光ビームとして照射し、散乱光が同じ対物レンズで回収されて回折格子で分光されることにより、散乱光のラマンシフトが測定される。

図 2(a)に重合していない FNW の模式図を、(b)に隣り合う C_{60} 分子どうしが四員環形成によって重合した FNW の模式図を示す。

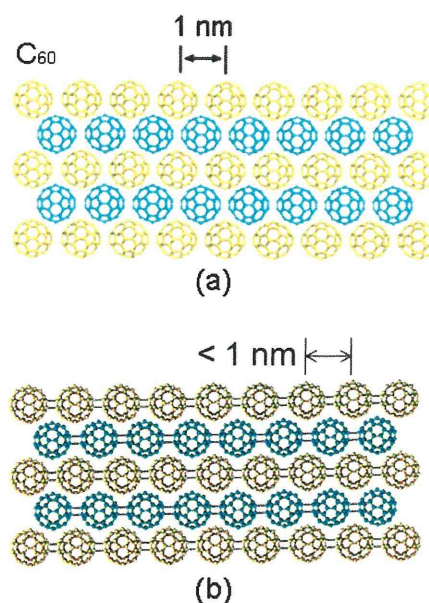


図 1 (a)FNW の van der Waals 結合モデル、(b)FNW の共有結合モデル

van der Waals 結晶の場合は、FNW は面心立方晶(FCC)であるが、重合によって成長軸方向に C_{60} 分子間距離が縮小するので、FCC 構造がゆがみ、体心正方晶の構造となる場合が観察されている[5]。

ラマン分光装置による FNW サンプルへの照射光量の調節は、ND フィルターによる光量の調節、および、対物レンズとサンプルとの間の距離の調節によって行うことができる。

図 2 の(a)~(f)に、レーザースポット面積と対物レンズの焦点はずれ量との関係を示した。サンプルが対物レンズに近づく方向がアンダーフォーカス側であり、焦点はずれ量を正の値で表示してある。また図 2 (g)に示すように、焦点はずれ量と照射面積と

の関係をグラフで表示した。

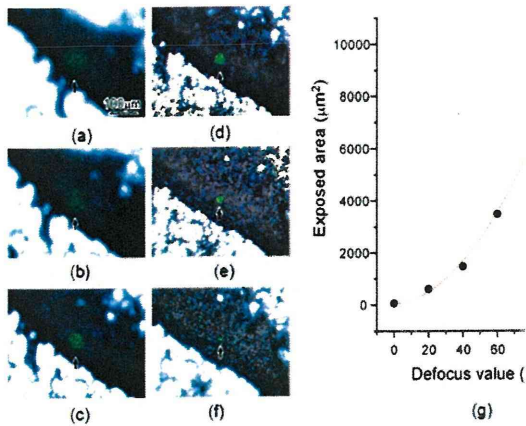


図2 FNW サンプル上へのレーザー光の照射状況。

焦点はずれ量は、(a) 100 μm、(b) 80 μm、(c) 60 μm、(d) 40 μm、(e) 20 μm、(f) 0 μm であり、矢印で示したスポット面積は、(a) 9270 μm²、(b) 6630 μm²、(c) 3480 μm²、(d) 1470 μm²、(e) 617 μm²、(f) 63.8 μm²。(g)焦点はずれ量と照射面積との関係

図3に、レーザー光の出力と ND フィルターの種類の関係を示す。ND フィルターの種類を示す OD 番号がひとつ上がると出力が約 1/10 に減少することが、OD1~OD4 の間に生じることが分かった。そこで、照射実験においては、この範囲の ND フィルターを用いることとした。

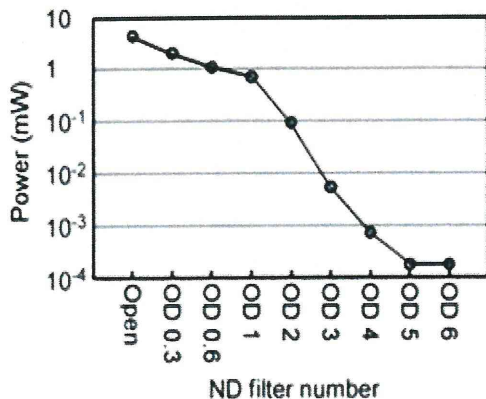


図3 ND フィルター番号とレーザー光出力との関係

図4に、以上の ND フィルター番号、焦点はずれ量、レーザー光出力密度の関係を示す。

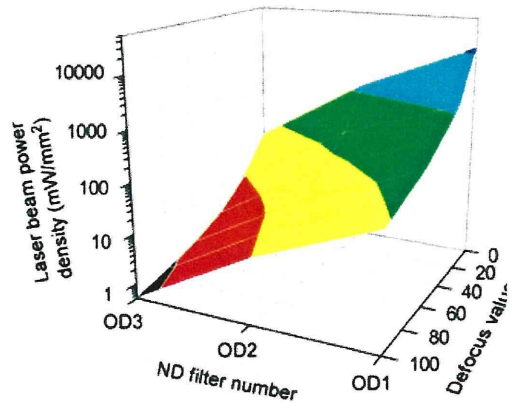


図4 ND フィルター番号、焦点はずれ量、及び、レーザー光出力密度の関係

C. 研究結果

1. FNW のサイズ分布

図5に走査電子顕微鏡(SEM)観察例を示すように、短いFNWが合成された。

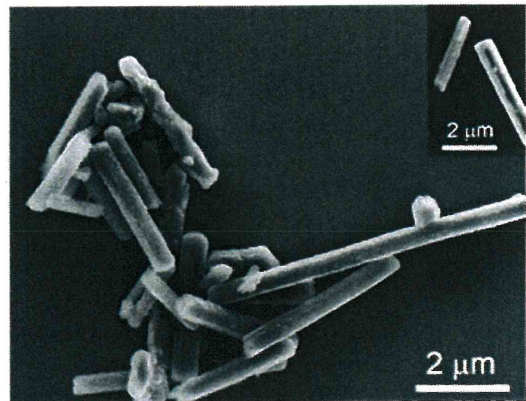


図5 真空乾燥したFNWのSEM像

図6に、合成されたFNWの長さや直径の分布を示す。平均長さは $4.4 \pm 2.7 \mu\text{m}$ 、平均直径は $540 \pm 161 \text{ nm}$ であった。

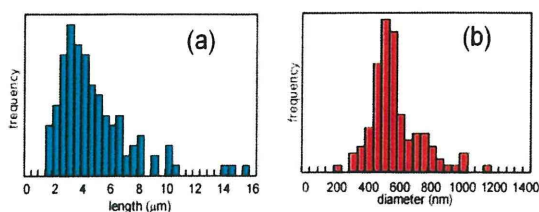


図6 FNW サンプルの(a)直径と(b)長さの分布

2. レーザー光出力密度の違いによる

FNW ラマンスペクトルの変化

レーザー光の照射時間を 220 秒としたときの出力密度の違いによる FNW ラマンスペクトルの変化を図 7 に示す。図の(c)、(b)、(a)の順に出力密度が増加するにつれて、 $A_g(2)$ ピークが 1468 cm^{-1} 、 1466 cm^{-1} 、 1460 cm^{-1} のように低波数側にシフトすることが分かる。光重合した C_{60} は、 1460 cm^{-1} に $A_g(2)$ ピーク位置を持つので[7]、図 7 より、レーザー光エネルギー дозиが増加するにつれて、FNW の重合が進行するようすが分かる。

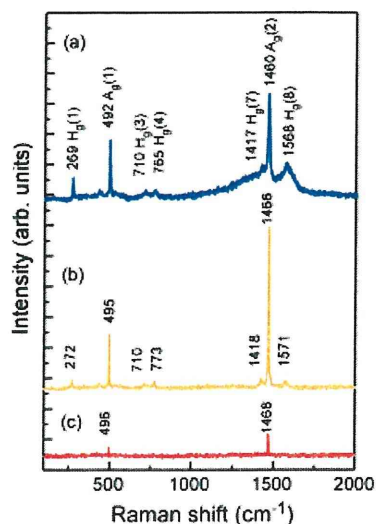


図7 (a) 11800 mW/mm^2 、(b) 1660 mW/mm^2 、(c) 71.5 mW/mm^2 で、FNW に 220 秒レーザー光を照射した場合のラマンスペクトル

図 7 の実験を様々なエネルギードーズ量に対して行い、多数のラマンスペクトルの $A_g(2)$ ピークの位置をプロットしたものを図 8 に示す。エネルギードーズ量の増加とともに $A_g(2)$ ピーク位置が低波数側にシフトし、特に、最高の出力密度(11800 mW/mm^2)においては、縦軸に平行な矢印で示されている $A_g(2)$ ピークが最も大きく低波数側にシフトしており、FNW の重合が進行していることが分かる。

図 9 に示すように、上記の矢印で示した点のエネルギードーズ量(x)と $A_g(2)$ ピークのラマンシフト量(y)の関係は、片対数プロットによる直線関係を当てはめることができ、 $y = -2.2x + 1467$ の式が得られた。

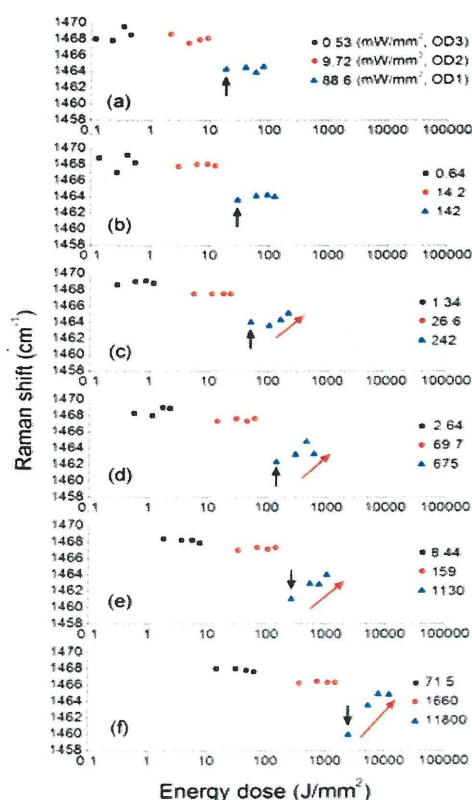


図8 各出力密度におけるエネルギードーズ量の間数としての FNW ラマンスペクトルの $A_g(2)$ ピークの位置