

正常 B6 マウスへの MWCNT 腹腔内投与では投与後 6 ヶ月前後での末梢血の T 細胞分化やサイトカイン分泌に影響があることを、平成 24 年度の研究で見出していたが、投与後 18 ヶ月では T 細胞分化に大きな影響は見られなかった。18 ヶ月後の変化として、MWCNT 投与による腹膜の肥厚、乳糜腹水貯留、肝臓の分葉状変化などの肉眼で変化が観察された。また、M1 マクロファージへの分化が促進していることも判明した。M1 マクロファージは炎症性サイトカインである TNF- α 、IFN- γ などを産生することが知られており、炎症を促進するような役割を有していることが知られている。18 ヶ月における加齢的变化と MWCNT 投与がどのように関連しているかは不明であるが、MWCNT の長期暴露により、マクロファージを介したサイトカインシフトの可能性が考えられる。

自己免疫疾患モデルである MRL/lpr マウスは Fas 遺伝子の変異を有し、全身のリンパ節腫脹に加え、関節リウマチ、SLE、シェーグレン症候群の疾患モデルとして知られている。病態は末梢での T 細胞の Fas を介した維持機構に異常を来すことによって、自己反応性 T 細胞の増殖が促進されてしまうと考えられており、活性化した T 細胞中に自己反応性 T 細胞を含んでいる可能性が知られている。MRL/lpr マウスでの、すでに偏った免疫状態における MWCNT の暴露では、末梢の免疫システムへの影響は細胞分画の点では大きな影響は観察されなかったが、投与後、1、2 ヶ月の段階で自己抗体の一つであるリウマチ因子が MWCNT 投与によって低下することが判明した。自己抗体の産

生と炎症状態は相関していることが知られているが、投与後 1、2 ヶ月は 3、4 ヶ月齢に相当し、MRL/lpr マウスのリウマチ因子が上昇してくる時期である。MWCNT 投与直後の免疫システムへの影響、特に自己抗体産生機序への影響が考えられた。

今後、自己免疫疾患病変への MWCNT の長期暴露の影響を確認する必要があり、自己抗体への影響を含め、免疫システム全体への影響を評価する予定である。MRL/lpr マウスの 6 ヶ月齢を過ぎると死亡し始めることから、このモデルでの投与実験は投与後 6 ヶ月が限度であると考えられる。

来年度は自己免疫疾患病変への MWCNT 長期暴露の影響、吸引実験との比較などを通してナノマテリアルの免疫システムへの影響を検討する予定である。

E. 結論

3. 正常 B6 マウスへの MWCNT 腹腔内投与による長期暴露によって、腹膜および腹腔臓器表層部に反応性の変化が観察された。
4. B6 マウスへの MWCNT 長期暴露によって腸間膜リンパ節の細胞数が減少していた。
5. B6 マウスへの MWCNT 長期暴露によって T 細胞への影響は確認されなかった。
6. B6 マウスへの MWCNT 長期暴露によって末梢での M1 マクロファージへの分化が促進していることが判明した。
7. MRL/lpr マウスへの MWCNT 暴露によって免疫細胞の分画には大きな影響は観察されなかった。
8. MRL/lpr マウスへの MWCNT 暴露にお

いて、投与後1、2ヶ月で自己抗体の産生が低下していた。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iizuka S, Ishimaru N, Kudo Y. Matrix metalloproteinases: the gene expression signatures of head and neck cancer progression. *Cancers*. 13:396-415, 2014
2. Yano K, Carter C, Yoshida N, Abe T, Yamada A, Nitta T, Ishimaru N, Takada K, Butcher GW, Takahama Y. Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in the mouse. *Eur J Immunol*. 44:561-572, 2014
3. Tsunematsu T, Takihara Y, Ishimaru N, Pagano M, Takata T, Kudo Y. Aurora-A controls pre-replicative complex assembly and DNA replication by stabilizing geminin in mitosis. *Nat Commun*. 4:1885, 2013
4. Kawakami E, Kawai N, Kinouchi N, Mori H, Ohsawa Y, Ishimaru N, Sunada Y, Noji S, Tanaka E. Local applications of myostatin-siRNA with atelocollagen increase skeletal muscle mass and recovery of muscle function. *PLoS One*. 8:e64719. 2013.
5. Shimizu N, Nakajima NI, Tsunematsu T, Ogawa I, Kawai H, Hirayama R, Fujimori A, Yamada A, Okayasu R, Ishimaru N, Takata T, Kudo Y. Selective enhancing effect of early mitotic inhibitor 1 depletion on the sensitivity of doxorubicin

or X-ray treatment in human cancer cells. *J Biol Chem*. 288:17238-17252, 2013

6. Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N. Targeting IL-1 in Sjögren's syndrome. *Expert Opin Ther Targets*. 17:393-401. 2013.
 7. Shikama Y, Ishimaru N, Kudo Y, Bando Y, Aki N, Hayashi Y, Funaki M. Effects of free Fatty acids on human salivary gland epithelial cells. *J Dent Res*. 92:540-546. 2013.
- ### 2. 学会発表
- (1) 新垣理恵子、山田安希子、工藤保誠、江口洋、三田村佳典、林良夫、石丸直澄：シェーグレン症候群モデルを用いたレバミピド点眼薬によるドライアイの改善効果とその作用機序 第102回日本病理学会総会 102巻1号：306 2013.6 札幌
 - (2) 岩浅亮彦、近藤智之、黒澤実愛、新垣理恵子、山田安希子、田中栄二、工藤保誠、石丸直澄：アロマトーゼ遺伝子欠損マウスにおける肥満とシェーグレン症候群様病変との関連 第102回日本病理学会総会 102巻1号：436 2013.6 札幌
 - (3) 近藤智之、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄：自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫システムの解析 第102回日本病理学会総会 102巻1号：439 2013.6 札幌
 - (4) Yamada A, Arakaki R, Kurosawa M, Kondo T, Koichi Y, Hayashi Y, Ishimaru N: Difient differentiation of Treg cells in a murine model of Sjögren's syndrome. 15th International Congress of

Immunology 25th Aug. 2013 Milan

- (5) 石丸直澄：シェーグレン症候群の病理診断の新機軸 第22回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2013.9 大阪
- (6) Yamada K, Iwasa A, Kondo T, Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Taquahashi Y, Takagi A, Kanno J, Ishimaru N: Invivo effect of multi-wall carbon nanotubes on immune system. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. Nov. 2013 Nagoya
- (7) Kurosawa M, Ishimaru N, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Kondo T: A novel role of CXCR7 in controlling autoreactive T cells of a murine model for Sjögren's syndrome. 第42回日本免疫学会総会 42巻：110 2013.12 千葉
- (8) Iwasa A, Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tanaka E, Kudo Y, Ishimaru N: Relationship between aromatase-related obesity and autoimmunity in Sjögren's syndrome. 第42回日本免疫学会総会 42巻：146 2013.12 千葉
- (9) Arakaki R, Eguchi H, Yamada A, Kudo Y, Mitamura Y, Hayashi Y, Ishimaru N: Eye drop administration of rebamipide is effective to a dry eye symptom in a model mice of Sjögren's syndrome. 第42回日本免疫学会総会 42巻：148 2013.12 千葉

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1

Experiment 1

Mice : ♀ C57BL/6 (8 weeks of age)
Group (n=5): 0 μ g/mouse, 1 μ g/mouse, 10 μ g/mouse
MWCNT: Taquann-treated MWCNT (MCNT-7, Mitsui)
was provided from Dr. Taquahashi and Dr. Kanno.
Vehicle: 0.1% Tween80/saline

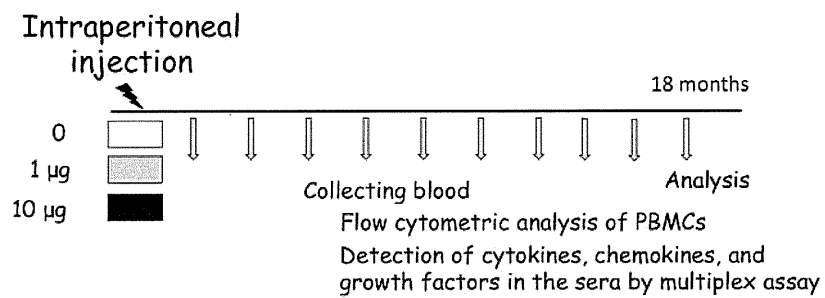


図1: 正常C57BL/6マウスへのMWCNT投与実験プロトコール

図2

Body Weight of MWCNT-administered Mice

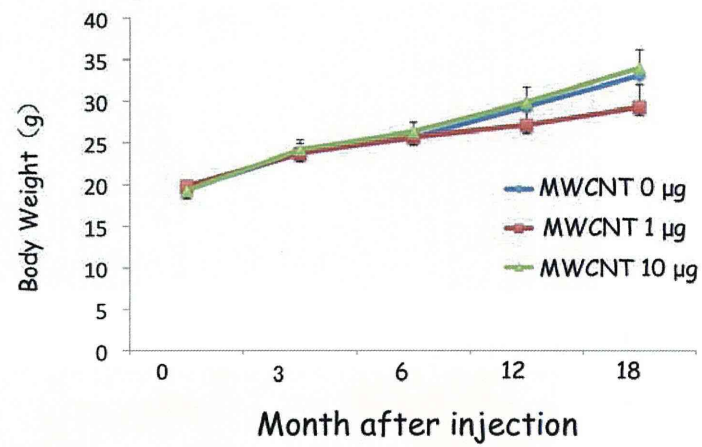


図2: 正常C57BL/6マウスへのMWCNT投与による体重変化。各群の体重を経時的に示す。結果は平均±SDで示す。

図3

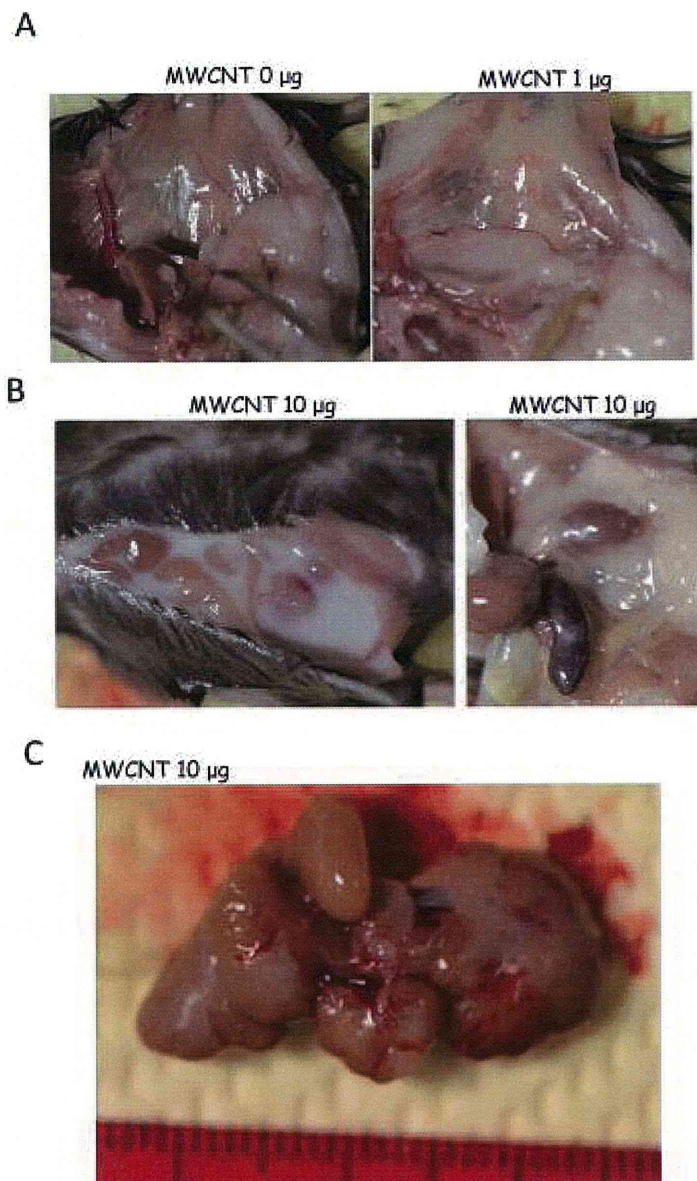


図3:MWCNT投与による腹腔内の肉眼的変化。(A)腹膜 (B)腹水および脾、腎表面の白濁肥厚 (C)肝臓の分葉状変化 写真は各群の代表。

図4

Effect of MWCNT Administration on Spleen and Mesenteric Lymph Node

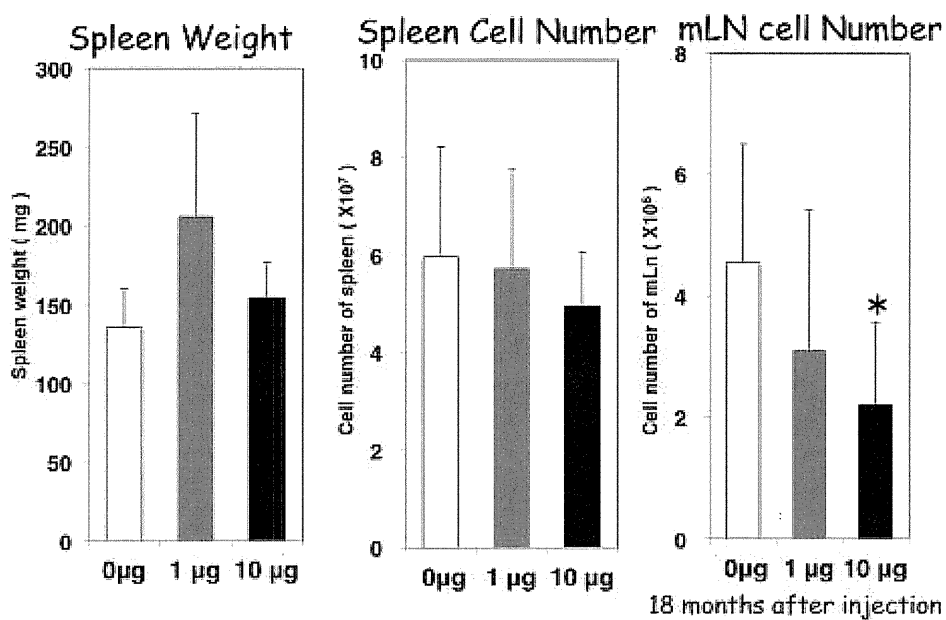


図4: MWCNT投与による脾重量、脾細胞数および腸間膜リンパ節細胞数の変化。結果は平均(n=5)±SDで示す。*p<0.05

図5

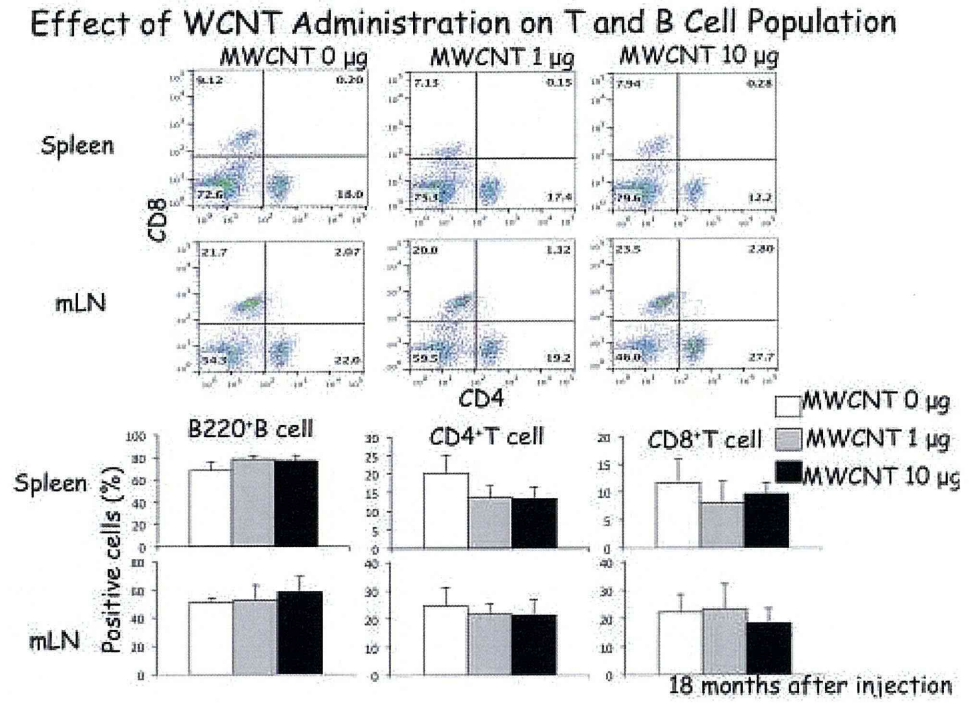


図5: MWCNT投与による脾臓および腸間膜リンパ節におけるT、B細胞分画の変化。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。下段のグラフの結果は平均(n=5)±SDで示す。

図6

Effect of MWCNT Administration on Regulatory T Cell (Treg)

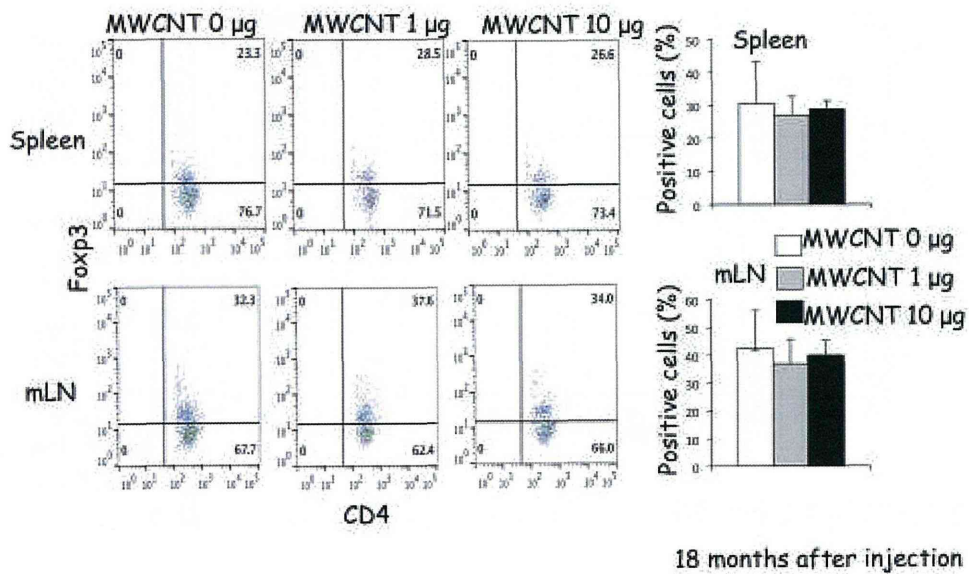


図6: MWCNT投与による脾臓および腸間膜リンパ節における制御性T細胞の割合の変化。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。グラフは平均(n=5)±SDで示す。

図7

Effect of MWCNT Administration on M1 and M2 Macrophage

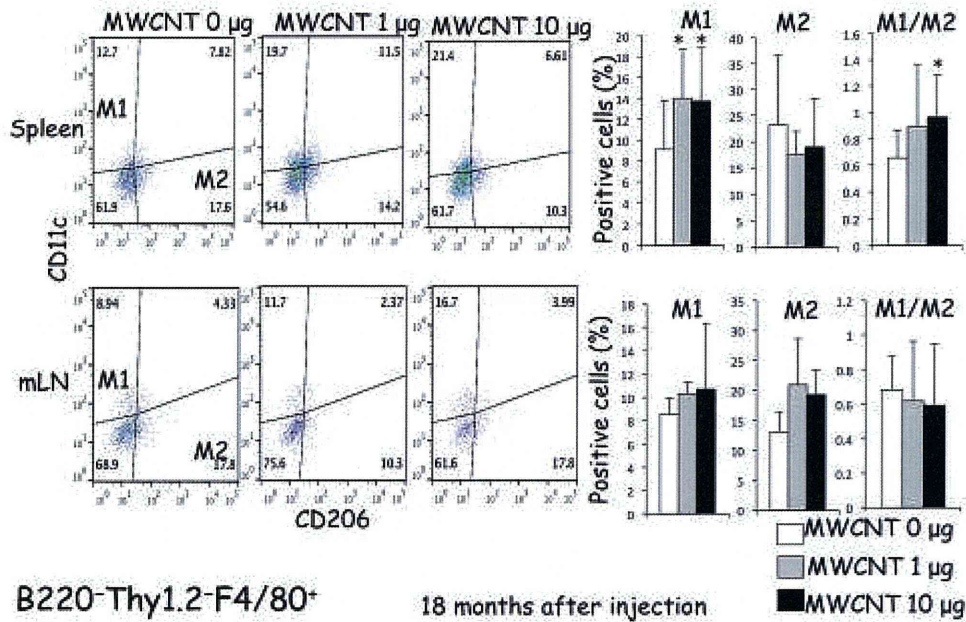


図7: MWCNT投与による脾臓および腸間膜リンパ節におけるマクロファージ分画への影響
 フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。
 グラフの結果は平均(n=5)±SDで示す。*p<0.05

図8

Experiment 2

Mice : ♀MRL/lpr (fas gene mutation, an model for autoimmune diseases such as SLE, RA, SS) and ♀MRL+/+ (control)

Group (n=5): 0 µg/mouse, 1 µg/mouse, 10 µg/mouse

MWCNT: Taquann-treated MWCNT (MCNT-7, Mitsui)
was provided from Dr. Taquahashi and Dr. Kanno.

Vehicle: 0.1% Tween80/saline

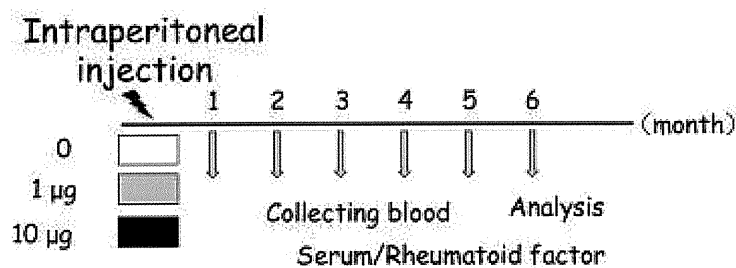


図8: MRL/lprマウスへのMWCNT投与実験プロトコール

Body Weight of MWCNT-injected MRL/lpr and MRL+/+ Mice (6m)

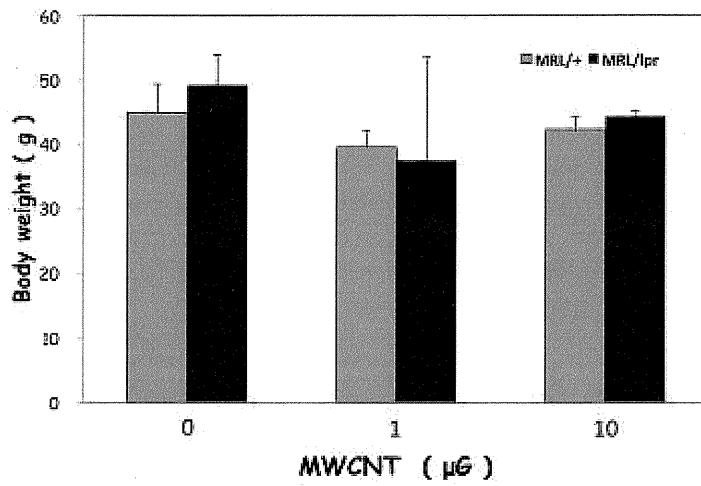


図9: MWCNT投与による体重変化。結果は平均(n=5)±SDで示す。

図10

Spleen Weight and Spleen Cell Number in MWCNT-injected Mice (6m)

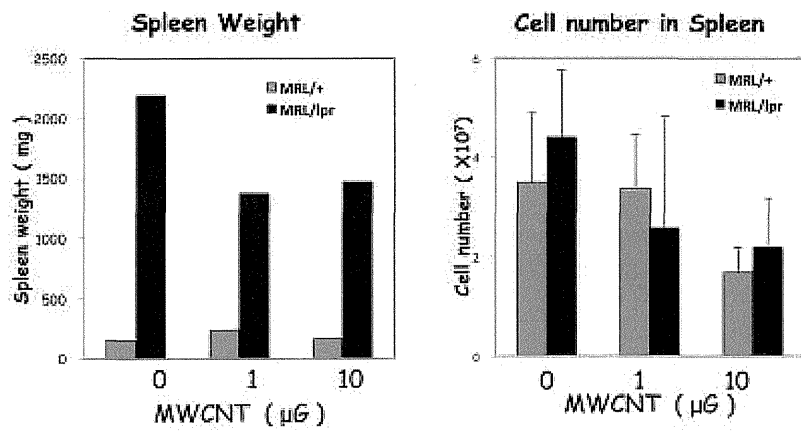


図10: MWCNT投与による脾重量と脾細胞数。結果は平均(n=5)±SDで示す。

図11

Effect of MWCNT administration on T population in MRL mice

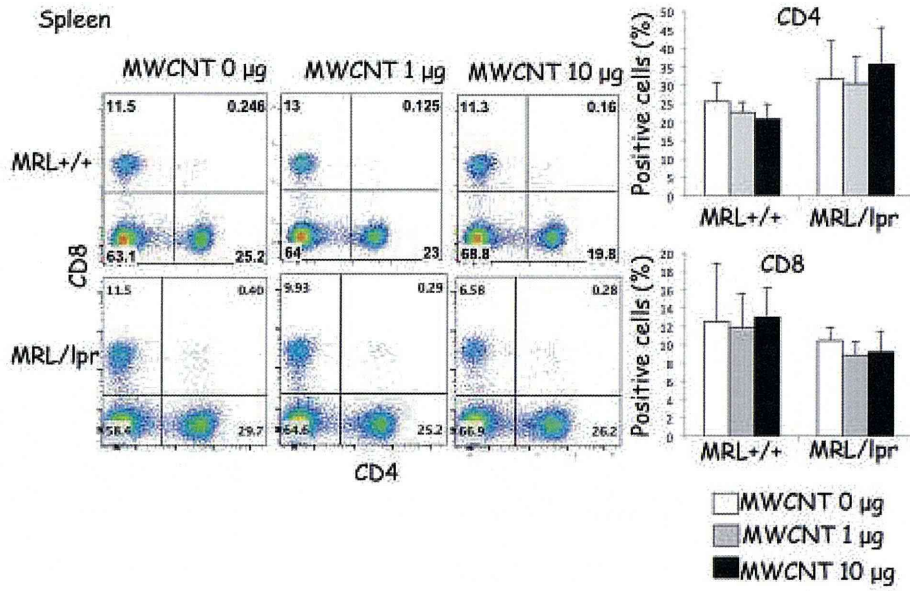


図11: MWCNT投与による脾臓におけるT細胞分画の変化。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。グラフの結果は平均(n=5)±SDで示す。

図12

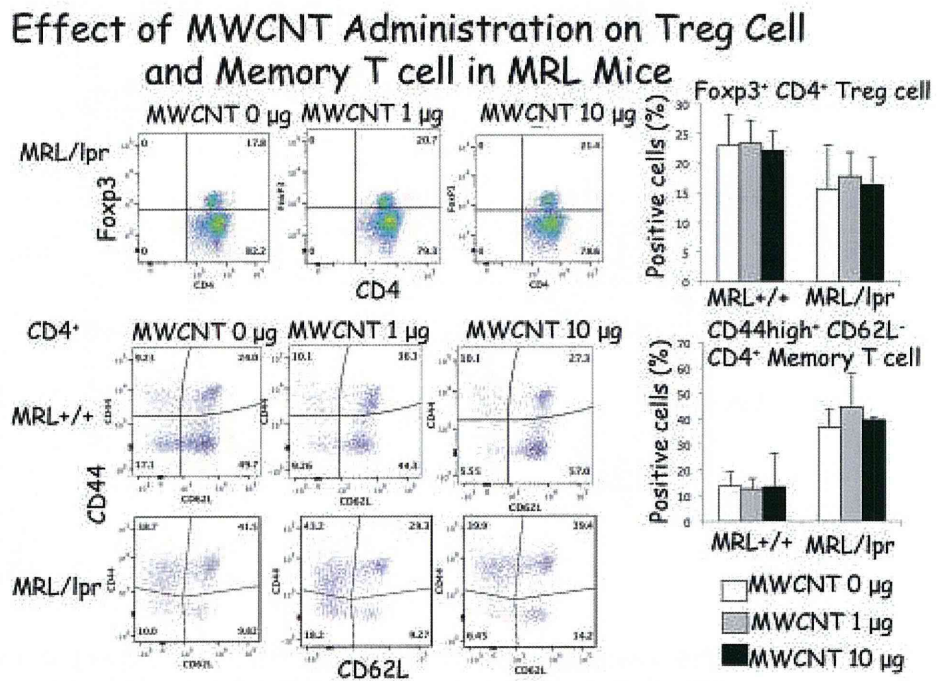


図12: MWCNT投与による脾臓における制御性T細胞とメモリー型T細胞への影響。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。結果は平均(n=5)±SDで示す。

図13

Effect of MWCNT Administration on Macrophage and DC in MRL Mice

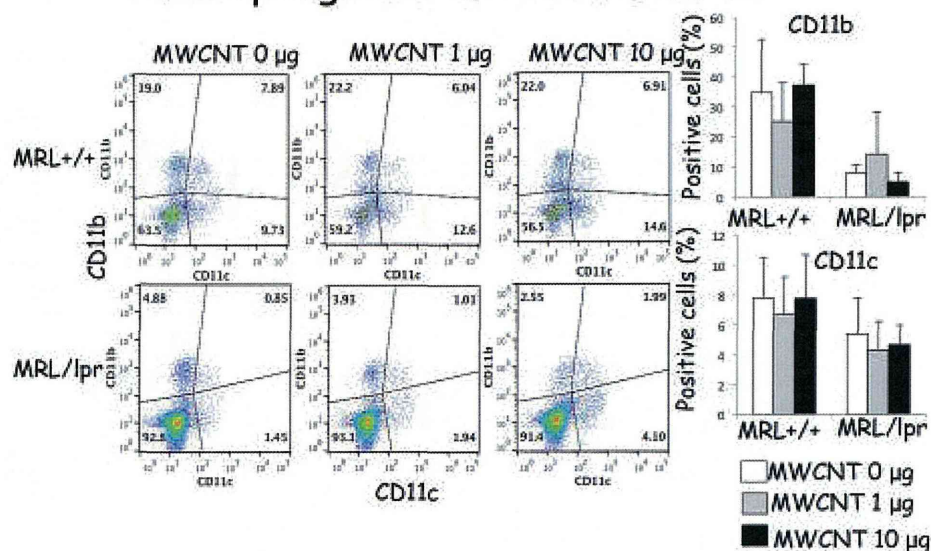


図13: MWCNT投与による脾臓におけるマクロファージ及び樹状細胞分画への影響。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。グラフは平均(n=5)±SDで示す。

図14

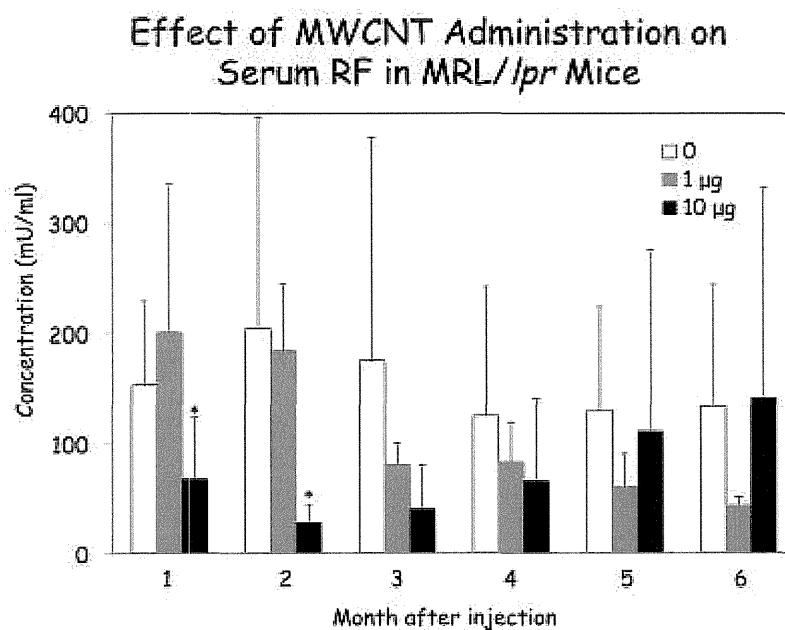


図14: MWCNT投与による血清リウマチ因子の経時的変化。
グラフは平均(n=5)±SDで示す。*p<0.05

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：若原 孝次 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 主幹研究員

平田 千佳 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

今野 俊生 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 ナノウィスカーに、C₆₀ よりもわずかに大きな C₇₀ 分子を固溶させることによって C₆₀ ナノウィスカーの物性を様々に変化させることができると期待される。そこで、本研究では、C₆₀ ナノウィスカーの成長が C₇₀ の添加によってどのように変化するかを調査した。また、C₆₀ ナノウィスカーの機械的な性質について、C₇₀ の添加によってヤング率がどのように変化するかを複合型透過電子顕微鏡を用いて調べた。その結果、固溶硬化の発現によって、C₆₀ ナノウィスカーのヤング率が C₇₀ の添加によって著しく増大することが見出された。

A. 研究目的

フラーレンナノウィスカーは、C₆₀、C₇₀、C₆₀[C(COOC₂H₅)₂]₂、Sc₃N@C₈₀ などの様々なフラーレン分子から構成される細いひげ結晶であり、その直径は 1000nm 未満と定義されている[1]。C₆₀ は直径 0.71nm の球形分子であり、C₇₀ は長径 0.85nm、短径 0.72nm のラグビーボール形の分子である。C₆₀ は紫外光も可視光も吸収するが、C₇₀ は C₆₀ に比べてより長波長の光を吸収する。それゆえ、C₆₀ と C₇₀ の両成分を含むフラーレンナノウィスカー(FNW)は広い波長の光を吸収することが可能となり、C₆₀ ナノウィスカー

(C₆₀NW)に比べて太陽電池や光センサーなどの光学デバイスにおいて、より広い波長での応用範囲が可能となる。また、C₇₀ 分子は C₆₀ 分子に比べて少し大きいため、C₆₀ ナノウィスカー(C₆₀NW)母相中に C₇₀ を固溶させることにより、結晶格子を歪ませる効果や転位の移動を妨げる効果によって、変形しにくくなり、C₆₀NW の機械的な強度が増大することが期待される。そこで、本研究では、C₆₀-C₇₀2 成分ナノウィスカー(C₆₀-C₇₀NW)の合成を行い、その機械的な性質を調べることを目的とした。

B. 研究方法

1. C₆₀-C₇₀NW の合成

C₆₀ 飽和トルエン溶液と C₇₀ 飽和トルエン溶液を作製し、それらを混合することによって、C₆₀ と C₇₀ の2成分を含有するトルエン溶液を作製した。この混合溶液を用いて、貧溶媒をイソプロピルアルコール(IPA)とする液-液界面析出法 (LLIP 法) によって、仕込み組成で、C₆₀-5mass%C₇₀NW、C₆₀-10mass%C₇₀NW、C₆₀-15mass%C₇₀NW、C₆₀-23mass%C₇₀NW を合成した。

2. C₆₀-C₇₀NW の機械的性質の評価

筑波大学木塚研究室の複合機能型透過電子顕微鏡 (複合 TEM) によって、C₆₀-C₇₀NW のヤング率を測定した。この複合 TEM は、原子間力顕微鏡(AFM)の探針を用いて試料に荷重を印加し、その荷重-変位曲線から試料のヤング率を計測できるように設計されている。

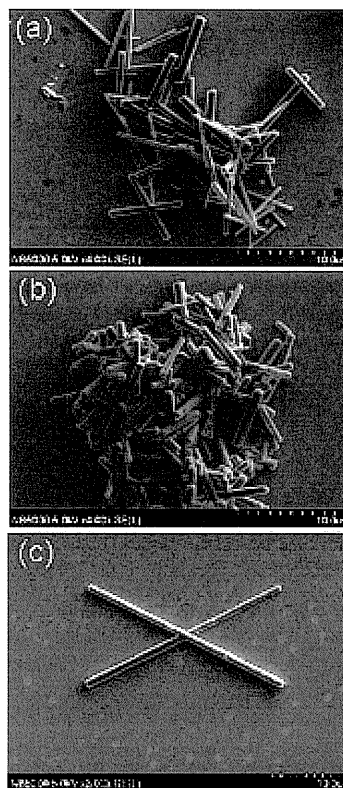


図1 (a)C₆₀-5mass%C₇₀NW、(b)C₆₀-10mass%C₇₀NW、(c)C₆₀-15mass%C₇₀NW の SEM 像

C. 研究結果

図1に示すように、直線形状で成長軸方向に沿って一様な直径を持つ C₆₀-C₇₀NW が合成された。表1に C₆₀-C₇₀NW の長さや直径の測定結果を示す。C₇₀ 含量の増加とともに直径が増加するのに対して、長さは C₆₀-10mass%C₇₀NW で最小となっている。

図2に、複合 TEM により測定された C₆₀-C₇₀NW のヤング率の組成依存性を示す。図の各記号は、○C₆₀NW、●C₆₀NW、▲C₆₀-5mass%C₇₀NW、■C₆₀-10 mass%C₇₀NW、▼C₆₀-15mass%C₇₀NW、◆C₆₀-23 mass%C₇₀ NW を示す。

C₇₀ を添加することにより、600nm~1200

表1 C₆₀-C₇₀NW の長さや直径の平均値

仕込み組成	長さ(μm)	直径(nm)
C ₆₀ -5mass%C ₇₀ NW	5.8±1.8	478±134
C ₆₀ -10mass%C ₇₀ NW	3.5±1.7	629±145
C ₆₀ -15mass%C ₇₀ NW	11.9±4.7	1040±375

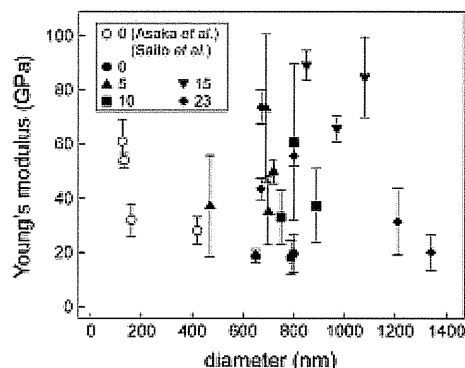


図2 C₆₀-C₇₀NW のヤング率の直径と組成依存性 (木塚徳志教授と松浦大輔氏のご厚意により文献[2]より転載)

nm 未満の範囲の直径において、C₆₀-C₇₀NW のヤング率が著しく増加することがわかる。

D. 考察

表 1 で C₆₀-10mass%C₇₀NW のときに長さが最小となることが分かった。これは C₇₀ の添加量が小さい場合は、C₇₀ は C₆₀NW の成長を阻害するように働くこと、すなわち、C₇₀ が C₆₀NW 上での C₆₀ の拡散を阻害することを示している。しかし、C₇₀ の添加量をさらに増加させると、より長く成長することがわかる。この現象は、添加量が少ないときは、C₆₀ の拡散を阻害する不純物として C₇₀ が作用するが、添加量がさらに増加すると、C₇₀ はフラーレン分子の脱溶媒和反応を促進して、フラーレン分子のウィスカー中への取り込みが容易になる結果、より長く成長するためと考察される。

図 2 で、直径 600nm ~ 1100nm の C₆₀-C₇₀NW において、C₇₀ 無添加のものに比べて、C₇₀ を添加したもののヤング率は、2 ~ 5 倍程度高くなっている。これは、C₇₀ 分子による固溶硬化によるものと理解される。

C₇₀ 無添加の C₆₀NW (○) のヤング率は直径の減少とともに増加しているが、これは、C₆₀NW の内部が軟らかく、外表面が硬いコアシェル構造になっているためである [3]。また、C₆₀-23 mass%C₇₀ の組成のものだけに注目すると、直径の増加とともにヤング率は急速に減少していることがわかる。これは、C₆₀-23 mass%C₇₀NW においても、コアシェル構造となっていることを示唆する。

また、図 2 で約 1350nm の直径の C₆₀-23 mass%C₇₀NW のヤング率は、C₇₀ 無添加の C₆₀NW (●) と同程度のヤング率となっており、C₇₀ の固溶硬化現象が反映されてい

ないように見える。これは、C₆₀-23 mass%C₇₀NW が太く多孔質なコアが支配的であるためと考察される。つまり、C₇₀ による固溶硬化の寄与に比べて、多孔質構造による軟化の寄与が強く働いているためであると考察される。

E. 結論

(1) C₆₀-C₇₀NW の直径は、C₇₀ の添加とともに増加した。しかし、C₆₀-C₇₀NW の長さは、C₇₀ の添加量が小さい場合は抑制されるが、添加量をさらに増加させると長さが増加することが見出された。

(2) C₆₀NW のヤング率は、C₇₀ を添加することによってもたらされる固溶硬化の発現によって、著しく増大することが判明した。

参考文献

- [1] Kun'ichi Miyazawa, J. Nanosci. Nanotechnol. **9** (2009)41
- [2] 松浦大輔, 今野俊生, 若原孝次, 宮澤薫一, 木塚徳志, “C₆₀/C₇₀ 合金ナノウィスカーのヤング率の組成依存性”, 2014 年春期講演大会 (第 154 回) 日本金属学会講演大会概要集, P.22
- [3] Ryoei Kato and Kun'ichi Miyazawa, Diamond & Related Materials, **20** (2011) 299

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Miyazawa, C. Hirata, R. Kano, T. Wakahara, H. Takeya, T. Yamaguchi, Y.