

学位論文題名

Surface modification of carbon nanotubes with calcifying solutions for biomedical applications

(バイオ医用応用のための石灰化溶液による
カーボンナノチューブの表面改質)

学位論文内容の要旨

〈目的〉カーボンナノチューブ (CNT) は炭素原子の 6 員環ネットが円筒状に閉じた、直径がナノメートルスケールの中空チューブで、近年最も注目されている材料の 1 つである。近年、主として電子・化学分野への応用開発が研究されており、バイオ分野での応用研究も開始されつつある。しかし、バイオ医用応用については、生体適合性について必ずしも十分検討されているとは言えずあまりなされていない。CNT の生体適合性向上のため、表面改質として、表面へのアパタイト析出が一方法と考えられる。本研究では、CNT 表面の生体親和性向上と薬剤の吸着・徐放などへの応用にむけて Ca と P を含む高濃度石灰化溶液中で CNT 表面にリン酸カルシウム化合物を析出させ、表面改質することを目的とした。

〈材料および方法〉500°C 大気酸化・酸処理により、金属触媒とアモルファスカーボンを除去した CNT (多層 CNT : 直径 20~60 nm) を蒸留水へ加え、15 分間超音波処理にて分散させた溶液 (CNT 混和液) を調製した。析出を加速するために CO₂ ガスで飽和し pH6.01 となるよう調製した通常的人工体液の濃度を約 6 倍にした高濃度リン酸カルシウム溶液 (0.7M NaCl, 0.02M NaHCO₃, 15mM CaCl₂, 9mM NaHPO₄ · 2H₂O: 以下、6 倍液と呼ぶ) に CNT 混和液を CNT 濃度が 80 ppm, 800 ppm となるよう添加し、37°C にて 5 分~1 日浸漬した。吸引ろ過にて CNT を分離後、脱イオン水にて洗浄した。6 倍液に任意時間浸漬した CNT および比較のため浸漬前の CNT と CNT 無添加で 6 倍液から HAP (Hydroxyapatite) を析出させ生成した。乾燥後、走査型電子顕微鏡 (SEM) (HITACHI 社製 S-4000) による表面観察を行い、析出物の結晶構造を同定するために、X 線回折パターン (XRD : RIGAKU 社製 Multi Flex) を測定した。また、SEM (HITACHI 社製 S-2380N) に付属したエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDS : EDAX-JENESIS) による元素分析、定量分析を行った。

カラムクロマトグラフィーによる CNT のタンパク質吸着・除放を解析するために、精製した 3.0 g の CNT を 1000ml の 6 倍液に既述の方法で調製した後、直ちに 0.8 μm 孔径の membrane filter にてろ過した。フィルター上に残った反応物を Dulbecco の PBS (phosphate buffered saline) に懸濁し、直径 15mm のカラムに

高さ 200mm になるように充填した。対照として、同サイズのカラムに未反応の CNT を充填して調製した。これら両カラムに、ウシ血清アルブミン（Cansera International 社製（カナダ）を 5mg 負荷し、PBS を流速 360ml/h で流して展開した。

〈結果および考察〉(1) 浸漬時間の影響：80ppm、800ppm CNT では進行にやや差があるが、概ね浸漬初期（5 分後）には、CNT 表面に苔様体が形成され、浸漬時間とともに約 90nm の粒状析出物（15 分後）が出現した。その後、綿状析出物（30 分後）が出現し、以後、苔様体は減少し、粒状・綿状析出物の量は増加する傾向を示した。粒状析出物は苔様体が消失した空間内に多く認められ、苔様体に変化して結晶成長したと考えられる。元素分析より、浸漬初期に出現した苔様体は Ca, P が検出されることから CNT 集合体上を薄く覆った膜状リン酸カルシウムであり、熱的に不安定で真空蒸着などの環境的变化により消失しやすいと考えられる。その後 CNT 表面にあった苔様体が形態変化を起こし、粒状析出物・綿状析出物が出現したと考えられる。元素分析から、Ca/P 比がおおよそ 1.0~2.0 のリン酸カルシウムであった。

(2) CNT 濃度の影響：CNT 添加量の少ない 80ppm では部位による石灰化の進行の差が大きく、析出物が観察されない CNT 集合体とともに、局所的には粒状・綿状析出物が早くから出現した。6 倍液は過飽和度が高く、時間が経過すると、それ自体で析出が進行する。CNT 量の少ない 80ppm では、CNT の存在する部位に限ることなく析出が進行し、部位による析出の程度が不均一になりやすい傾向を示す。一方で CNT 添加量の十分に多い 800ppm では石灰化はより均一に、経時的にやや遅延して進行する傾向が見られた。これは CNT の量が増加すると、リン酸カルシウムの石灰化反応がより広汎な領域で CNT 表面への吸着・析出のプロセスが比較的均一に進行し、結果的に石灰化速度が低下したと考えられる。

(3) 球状集合体：CNT 浸漬 24 時間後の時点で、CNT 無添加、80ppm・800ppm 添加ともに球状集合体（直径約 3 μ m）が観察され、CNT 濃度の低い 80ppm では球状体中に CNT は認められず、CNT 無添加の場合に形成される HAP のみの球状体とほぼ同等であった。一方、800ppm では浸漬 1 日後、CNT を含む球状集合体として形成された。80ppm と CNT 濃度が低い場合には、過飽和リン酸カルシウムの析出速度が大きく、CNT とは無関係にそれ自身で析出し、CNT 濃度の高い 800 ppm ではリン酸カルシウムが CNT 表面で析出する確率が高くなり、時間の経過に伴い、石灰化の進行とともに綿状析出物や粒状析出物が集合し、球状化したと考えられる。球状体同士は深部で CNT 同士が絡み合い凝集していると示唆される。X 線回折から、CNT 無添加の 6 倍液で得られた球状集合体は、結晶性の比較的低いハイドロキシアパタイトと確認され、CNT 添加（800ppm）では半値幅がより広く、さらに結晶性は劣っていた。

(4) タンパク質吸着特性：カラムにウシ血清アルブミンを通過させたところ、無処理 CNT ではカラムに吸着されず、素通りして、最初に溶出するのに対し、6 倍液と 1 時間反応後の CNT（3000ppm）では、Dulbecco の PBS でほとんど溶出せず、さ

らに 2M NaCl, 4M NaCl でも溶出せず、強い溶出液である 0.5M Tris 溶液によって初めて溶出した。このことは、前処理によって、リン酸カルシウムが CNT に結合した事を示している。SEM や EDS ではリン酸カルシウムの存在が明確に確認されていないにもかかわらず、吸着挙動に明らかな違いを示した事実は、SEM に観察されない程度の僅かなリン酸カルシウムが CNT 表面を被覆または析出しており、吸着の効果を発揮したことを示唆している。このことは析出のごく初期の状態でも効果的な物理化学的機能が発揮されることを示している。

〈まとめ〉今回の結果より、石灰化溶液浸漬により CNT 表面へのアパタイトを含むリン酸カルシウム化合物の析出・結晶化が進行した。ごく短時間の表面処理でも CNT の機能性を調節できることが証明され、生体親和性の向上と BMP 等の成長因子や薬剤の吸着・除放等への応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 亘 理 文 夫

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 佐 野 英 彦

学 位 論 文 題 名

Surface modification of carbon nanotubes with calcifying solutions for biomedical applications

(バイオ医用応用のための石灰化溶液による
カーボンナノチューブの表面改質)

提出論文の要旨

カーボンナノチューブ (CNT) は近年、最も注目されている材料であり、エレクトロニクスやエネルギー分野で研究開発が進行中である。しかし、バイオ医用応用については、生体適合性が必ずしも十分とは言えずあまりなされていない。本研究では、CNT の生体親和性向上のために、Ca を含むリン酸溶液中でリン酸カルシウム化合物を析出させ、表面改質を行うことを目的とした。

バイオ用の高純度 CNT を得るために、CNT (多層 CNT: 直径 20~60 nm) 原粉末から強酸処理・大気中 500℃焼却により金属触媒とアモルファスカーボンを除去し、蒸留水中 15 分間超音波処理し分散させた溶液 (CNT 混和液) を調製した。リン酸カルシウムの析出には、析出を加速するために通常の人身体液の約 6 倍の高濃度リン酸カルシウム溶液 (0.7M NaCl, 0.02M NaHCO₃, 15mM CaCl₂, 9mM NaHPO₄·2H₂O) (以下、6 倍液) を CO₂ ガスで飽和し pH6.01 となるように調製し、これに CNT 混和液を CNT 濃度が 80ppm、800ppm となるよう添加し、37℃にて 5 分~1 日浸漬した。吸引ろ過にて CNT を分離、脱イオン水にて洗浄、乾燥後、走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面観察、エネルギー分散型 X 線分析装置 (SEM-EDS) による元素分析、X 線回折 (XRD) による結晶同定を行った。

カラムクロマトグラフィーによる CNT のタンパク質吸着・除放を解析するために、精製した 3.0 g の CNT を 1000ml の 6 倍液に既述の方法で調製した後、直ちに 0.8 μm 孔径の membrane filter にてろ過した。フィルター上に残った反応物を直径 15mm のカラムに高さ 200mm になるように充填した。対照として、同サイズのカラムに未反応の CNT を充填して調製した。これら両カラムに、ウシ血清アルブミンを 5mg 負荷し、PBS を流速 360ml/h で流して展開した。

(1) 浸漬時間の影響：浸漬初期（概ね5分後）に苔様体が、浸漬時間とともに約90nmの粒状析出物（15分後）、綿状析出物（30分後）が出現し、以後苔様体の減少とともに粒状・綿状析出物が増加する傾向を示した。元素分析でCa, Pが検出され、電顕観察用の真空蒸着時に消失が認められることから、苔様体はCNT集合体上を薄く覆った熱的に不安定な膜状リン酸カルシウムであり、粒状析出物は苔様体が消失した空間内に多く認められ、苔様体に変化して結晶成長したと考えられる。

(2) CNT濃度の影響：CNT添加量の少ない80ppmでは部位による石灰化の進行の差違が大きく、析出物が観察されない部位とともに、局所的には粒状・綿状析出物が早くから出現するのに対し、添加量の十分に多い800ppmでは石灰化はより均一に、経時的にやや遅延して進行する傾向が見られた。6倍液は過飽和度が高く、時間の経過とともにそれ自体で析出が進行するため、CNT量の少ない80ppmではCNTの存在する部位に限ることなく析出が進行し部位による析出が不均一になりやすいが、CNTの量が増加すると石灰化反応がより広汎に比較的均一に進行し結果的に石灰化速度が低下したと考えられる。

(3) 球状集合体：浸漬24時間後、CNT無添加、80ppm・800ppm添加のいずれにも球状集合体（直径約3 μ m）が観察されたが、CNT無添加ではX線回折でハイドロキシアパタイト（HAP）と確認されSEM観察では板状結晶子が集合したHAPのみの球状体であり、CNT低濃度の80ppmでの球状体もこれに類似しているのに対し、800ppmではX線回折の半値幅から結晶性の劣るリン酸カルシウムとCNTからなる球状集合体であった。CNT濃度が低い場合には、過飽和リン酸カルシウムの析出速度が大きく、CNTとは無関係にそれ自身で析出し、CNT濃度の高い800ppmではリン酸カルシウムがCNT表面で析出し、石灰化の進行とともに綿状析出物や粒状析出物が集合し、球状化したと考えられる。

(4) タンパク質吸着特性：カラムにウシ血清アルブミンを通過させると、無処理CNTではカラムに吸着されずほぼ素通りし、最初に溶出するのに対し、6倍液と1時間反応後のCNT（3,000ppm）では、SEMやEDSではリン酸カルシウムの存在が明確に確認されないにもかかわらず、DulbeccoのPBSでほとんど溶出せず、さらに2M NaCl, 4M NaClでも溶出せず、強い溶出液である0.5M Tris溶液によって初めて溶出した。このことは、SEMに観察されない程度の僅かなリン酸カルシウムがCNT表面を原子的オーダーで被覆または析出しており、吸着挙動に明らかな違いを示したのであり、析出のごく初期の状態でも効果的な物理化学的機能性が発揮されることを示している。

以上の結果より、石灰化溶液浸漬によりCNT表面へのアパタイトを含むリン酸カルシウム化合物の析出・結晶化が進行し、ごく短時間の表面処理でもCNTの機能性を調節できることが実証され、生体親和性の向上とBMP等の成長因子や薬剤の吸着・除灰等への応用の可能性が示唆された。

これに対して審査委員から、

① 疎水性、凝集性のCNTはどのようにして親水性、分散性が向上するのか？

- ② CNT の処理液として 6 倍液を用いた理由
- ③ 球状体の内部構造と CNT の関係について
- ④ HAP 以外に他のリン酸カルシウム化合物は含まれていないか？
- ⑤ カラムクロマトグラフィーで CNT 濃度を 3000ppm にした理由。
- ⑥ CNT とアルブミンの結合様式について
- ⑦ EDS、SEM で検出できない程度のごく微量のリン酸カルシウムがカラムクロマトグラフィーに大きな影響を与えることが示されたが、これを検出する方法として何が考えられか？
- ⑧ 親水化処理した CNT としない CNT では吸着特性が変わるのではないか。
- ⑨ CNT とアルブミンの結合様式の解析には affinity chromatography の適用も有効ではないか。
- ⑩ 今後の CNT の応用として、抗生物質や抗凝固剤(ワーファリン)、BMP の吸着・除放などの可能性は考えられるか。

等の質問やコメントが出され、論文提出者はそれぞれに的確に回答し、考察や展望についても言及した。

論文提出者は、本研究を通して CNT の今後のバイオ医療応用への発展性を示唆する結果を提起し、臨床応用につながる将来性の点においても評価できる。また基礎的研究を遂行する過程で得られた知見と能力を社会人大学院修了後も臨床の場で活かしていく意欲も持ち併せている。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと判断し、主査ならびに副査は合格と判定した。