

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19340178
 研究課題名（和文）マルチプラズマ源による生体適合型カーボンナノチューブデバイス創製と生体信号計測
 研究課題名（英文）The creation of life-body compatibleness type carbon nanotube device by multi-plasma source and living-body signal measurement
 研究代表者
 平田 孝道 (HIRATA TAKAMICHI)
 武蔵工業大学・工学部・准教授
 研究者番号：80260420

研究成果の概要：

カーボンナノチューブを塗布・分散した金電極基板を用いて、近年再生医療で注目されている神経幹細胞の培養実験を行った。プラズマアクティベーション処理したCNT上では、無処理に比べて神経幹細胞から神経細胞（ニューロン）への分化・伸長が促進されることが判明した。また、小動物（ラット）を用いた模擬バイオセンサの埋め込み実験を行った結果、接着剤等の選択に問題が多少あるが、全体的に親和性が高いことが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：プラズマ科学・プラズマ科学

キーワード：生体埋め込み型バイオチップ、プラズマアクティベーション、OH・COOH基の形成、生体適合性・親和性、神経幹細胞、神経細胞（ニューロン）、生体埋め込み

1. 研究開始当初の背景

現在単層カーボンナノチューブ (Single-Walled Carbon Nanotubes, SWNTs) 及び多層カーボンナノチューブ (Multi-Walled Carbon Nanotubes, MWNTs) に代表されるナノカーボン類の基礎及び応用に関する研究は、国内外の大学や民間研究所の化学・固体物理・ナノ材料分野で盛んに行われている。しかし、

本申請研究課題のように、プラズマ科学、デバイス工学、表面・界面化学、生体分子学等の学際的分野を駆使した研究は、国内外における実施報告例が殆ど無いというのが現状である。特に新材料を駆使したナノバイオデバイスは、ナノテクノロジー・バイオテクノロジー・メディカルサイエンスの多面性を必須とするマン・マシンインターフェースの実現

に必要不可欠である。シリコンを主とする無機物系材料は、固体、液体、気体における熱・化学的安定性と制御性が良く、高い信頼性が得られるが、原子・分子単位的设计性、柔軟性、並びに生体適合性に乏しい。近年の有機合成分野における分子を基本単位とする新機能性物質の創製とそれら代替物質による新概念の構築が加速的に展開されている。

以上の背景から、当該研究課題であるカーボンナノチューブベースのナノバイオデバイス創製並びにそれらの生体適合化に関する開発技術を確立することは、日本におけるナノ及びバイオテクノロジー産業の現状を活性化して国際競争力強化に直結する新産業創出のキープポイントと成り得ると考えている。

2. 研究の目的

イオンもしくはラジカル照射法を用いたカーボンナノチューブの表面改質（プラズマアクティベーション）処理等の効果的複合により、新機能性を発現させた“カーボンナノチューブベース生体埋め込み型ナノバイオセンサ”の開発を目指した基礎研究を行う。初年度は、ナノバイオセンサの作製及び生体適合性の検証を行い、次年度ではラット等の生体にナノバイオセンサを埋め込んだ場合の適合性（親和性）及び神経活動信号の検出を行い、それらの効果に対する総合的評価・分析を行う。

3. 研究の方法

フェーズⅠ：生体埋め込み型ナノバイオセンサの作製及び新機能性評価

実験手順は、以下の通りである。カーボンナノチューブに細胞との親和性を持たせるために、プラズマイオン照射による表面改質処理つまり“プラズマアクティベーション”を用いた官能基形成を行う。具体的には、酸素プラズマ中による酸素イオン照射を行い、ナノチューブ

表面に生体適合に適している官能基（水酸基：OH、カルボキシル基：COOH）を形成させる。この場合、イオンエネルギー上昇によるナノチューブの変形及び破壊が考えられるので、照射エネルギーの最適値を明確にする。特に、O₂導入量、プラズマ発生用電源投入電力、イオン照射時間の変化に伴うCOOH基及びOH基の形成量を、X線光電子分光(XPS)を用いて測定を行う。

フェーズⅡ：培養細胞及び神経線維束を用いたナノバイオセンサの生体適合性に関する実験・評価及びプラズマアクティベーション効果の検証

作製したナノバイオセンサにおける生体への適合性を確認するため、2段階の実験・評価を行う。具体的には、まず細胞単体による生体適合性の確認を行い、次の段階では生体から摘出した神経線維束を用いて生体適合性の評価を行う。

【培養細胞を用いた場合】

培養チャンバー及び増殖促進ガスを用いて細胞を培養する。具体的には、ナノバイオセンサ表面に培養細胞切片を置き、増殖した細胞とナノバイオセンサの状態を光学顕微鏡等により観察する。特に、細胞とナノバイオセンサ周辺及びSWNTs周辺における状態を詳細に観察し、適合性の評価を行う。

フェーズⅢ：ラットを用いた埋め込み型ナノバイオセンサの実証実験

バイオナノセンサをラットの神経線維束に直接接合（最終的には、高い密着性を有する癒着化）させて伝達信号の直接計測を行う。実験手順は、以下の通りである。

①ラットの神経が通っている部位を切開して神経線維束をクランプする。この場合、センサを埋め込む神経としては、再生が困難である中枢神経ではなく、末梢神経を対象とする。具体的には、体内で最も長く太い神経であり、下肢の屈曲を司る座骨神経、耳介で受取った

音を伝達する後耳介神経、並びに舌で感じる味覚を伝達する鼓索神経を対象とする。

- ② バイオナノセンサを神経線維束の切断面に挟み、固定する。
- ③ バイオナノセンサの神経貫通孔内に軸索から再生・伸長した軸索側枝が定着するまでの1～2ヶ月程度経過を観察する。その場合、電極の生体適合性を確認するための生体検査を行い、プラズマアクティベーションの有効性について総合的評価を行う。
- ④ 神経線維束からの信号検出を行い、金属電極の場合と比較する。この場合、信号／ノイズ比(S/N比)についても比較・検討を行い、ナノバイオセンサの性能評価を行う。更に、電極形状及び神経貫通孔の内径が異なるナノバイオセンサを用いた実験を行い、カーボンナノチューブの配向密度と信号検出感度の相関関係を調べる。

4. 研究成果

(1) 生体埋め込み型バイオチップ作製のための予備実験及び新機能的評価

プラズマアクティベーション処理装置を用いたバイオチップ表面への生体物質の化学修飾を行った。具体的には、ポリエチレングリコール(PEG)をグラフト処理した単層CNTをバイオチップ上の電極間に塗布・架橋させた後、プラズマアクティベーション処理装置にてプラズマイオン照射処理を行った。プラズマ発生用導入ガス種は大気(主に N_2 : 78.08%、 O_2 : 20.95%)であり、照射時間は15～30minである。対象物質は、牛血清アルブミン(BSA)と抗BSA(anti-BSA)抗体であり、CNTにanti-BSAを化学修飾し、BSAを滴下して実験を行った。まず未処理状態(anti-BSAはCNTに未修飾の状態)の場合、バッファ溶液(緩衝液)中のBSAは負に帯電するため、インピーダンスは緩やかに減少する。(BSAはCNTに無結合。)一方、プラズマ

アクティベーション法ではanti-BSAへの結合に起因したインピーダンス上昇が観察されている。また、人工DNA(オリゴヌクレオチド)を用いた実験においても同様の変化が得られており、プラズマアクティベーションによる表面処理法が有効な手段であることが判明した。また、COOH基形成率が約20%であったが、最終的には50%以上を目標とした実験条件の把握を行う。特に、OH及びCOOH基の形成比率変化と、CNTと生体物質の結合状態が不明確であるため、ガス種並びにプラズマイオンエネルギーを変化させた場合の詳細な分析・評価を行い、高効率形成を目指す必要である。

(2) 培養細胞及び神経線維束を用いたナノバイオセンサの生体適合性に関する実験・評価及びプラズマアクティベーション効果の検証

更に、中枢神経の再生医療において近年注目されている神経幹細胞をプラズマアクティベーション処理したCNT上に成長・伸長させる実験を行った。その結果、プラズマ処理を行ったCNT上では、無処理に比べて神経幹細胞から神経細胞(ニューロン)への分化が促進されることが判明した。

(3) ラットを用いた埋め込み型ナノバイオセンサの実証実験

前年度の実験結果を踏まえて、まず模擬バイオセンサ(シリコーン樹脂[ポリジメチルシロキサン:PDMS]でコーティングしたマイクロチップ)を作製し、小動物(ラット)を用いた長期間に亘る埋め込み手術後の経過観察による生体組織との親和・適合性に関する総合的評価を行った。その結果、PDMSについては非常に親和性が高いことが判明したが、シリコーン接着剤については長期間埋め込みによる侵食・溶解が観察されており、材料の選択が必要であることも判明した。また、埋め込み期間については、2週間前後までは皮膚の炎症等が改善されていたが、それ以後には炎症がみられることから、

炎症等を最小限に留めるための工夫（前述の接着剤の選択、抗炎症剤の投与、埋め込み位置の検討等）が必要であるといえる。

さらに、ポリエチレングリコール（PEG）にてグラフト処理を施したカーボンナノチューブ（PEG-CNT）と神経再生型電極（シーブ電極）を用いた培養細胞の活動電位計測（主に、ラット心筋細胞）及びラットの生体信号計測（主に脳感覚野）を行った。その結果、ラットの生体信号計測については計測することが可能であることが判明したが、PEG-CNTが束状になって電極上に架橋しているため、分解能については問題点があるといえる。

また、プラズマ CVD 法及び熱 CVD 法を用いた触媒金属（プラチナ・コバルト薄膜）から構成される電極からの CNT 直接成長実験については、架橋した CNT を形成することが可能であるが、CNT 密度が低い等の問題点もあることが判明しており、更なる改善が必要であるといえる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① T. Hirata, S. Amiya, M. Akiya, O. Takei, T. Sakai, T. Nakamura, J. K. Tsuzuku, T. Yamamoto, and R. Hatakeyama, Chemical Modification of Carbon Nanotube Based Bio-Nanosensor by Plasma Activation, Japanese Journal of Applied Physics, Vol.47, 2067-2071, 2008、査読有り。

② 平田孝道、畠山力三、金子俊郎、岡田健、秋谷昌宏、島谷祐一、一木隆範、赤木貴則、ナノスコピックプラズマプロセスによるバイオデバイス構築、プラズマ・核融合学会誌、第 83 巻、647-657、2007、査読有り。

〔学会発表〕（計 1 件）

① T. Hirata, M. Akiya, and T. Sakai, Culture of Neural Stem Cells on Carbon Nanotube Based Bio Nanosensor Treated by Plasma-Activation Method, Proceeding of the International Interdisciplinary- Symposium on Gaseous and Liquid Plasmas (ISGLP2008), 2008 年 9 月 6 日, Sendai (Japan).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bme.tcu.ac.jp/index.html>

<http://www.bme.tcu.ac.jp/lab/03/hirata/bme-top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 孝道 (HIRATA TAKAMICHI)
武蔵工業大学・工学部・准教授
研究者番号：80260420

(2) 研究分担者

島谷 祐一 (SHIMATANI YUICHI)
武蔵工業大学・工学部・准教授
研究者番号：2015426

秋谷 昌宏 (AKIYA MASAHIRO)
武蔵工業大学・工学部・教授
研究者番号：60231833

畠山 力三 (HATAKEYAMA RIKIZO)
東北大学・工学（系）研究科（研究院）・教授
研究者番号：00108474