カーボンナノチューブの安全性

Safeness of carbon nanotubes

佐藤義倫^{*✧}, 横山敦郎^{**}, 柴田健一郎^{**}, 亘理文夫^{**}, 田路和幸^{*}

Yoshinori Sato^{*✧}, Atsuro Yokoyama^{**}, Ken-ichiro Shibata^{**}, Fumio Watari^{**} and Kazuyuki Tohji^{*}

Carbon nanotubes (CNTs) have single- or multi-cylindrical graphene structures that possess diameters of a few nanometers, while the length can be up to a few micrometers. Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) possess a high tensile strength and ultra-light weight, and have excellent chemical and thermal stability. They also possess semiconducting and metallic conductive properties. These anomalous features have led to many proposed applications in the biomedical field, including biosensors, drug and vaccine delivery. However, CNTs could have unusual toxicological properties, in that they share intermediate morphological characteristics of both fibers and nanoparticles. This review presents the cytotoxicity and biocompatibility of CNTs. Finally, we report the activation of the human acute monocytic leukemia cell line THP-1 *in vitro* and the response in subcutaneous tissue *in vivo* to MWCNTs of different lengths.

KEYWORDS : Carbon nanotubes, Cytotoxicity, Size effects, Biocompatibility, Inflammatory

1. はじめに

近年、「組織工学」¹⁾、「再生医療」²⁾と呼ばれる新たな形の医療が注目を集めている。再生医療の目的は、従来の薬物療法や外科療法では対処できないほど大きく損傷した生体組織や臓器を治療することにあり、その最大の特徴は細胞を利用して生体組織を再生、もしくは再構築する点にある。また、自身の幹細胞から組織を再生することが可能であれば、拒絶反応を起こさないため、次世代の治療法として期待が高まっている³⁾。このように再生医療はこれまでとは大きく異なる新しいタイプの医療として注目され、医学、生化学、工学などの幅広い分野から研究が進められている。再生医療には大きく分けて2つのグループがあり、1つは生体外 (*in vitro*) で組織を再構築して、それを移植するグループ²⁾と、もう1つは生体内 (*in vivo*) において何らかの方法で生体のもつ自己修復能力を助けて組織を再生させるグループである³⁾。これらには生体親和性の材料が必要であるという共通点がある。生体組織は細胞と細胞外マトリックスから成り立っており、細胞の分化・増殖には細胞外マトリックスがスカフォールド(足場)の役割を果たしている。胎生期や組織の損傷が小さい場合には、細胞外マトリックスは自然に形成される。しかし、誕生後何年か経過してから組織に大きな欠損が生じると、スカフォールドを人為的に提供しなければ細胞は増殖しにくく、組織の再生も再構築も進行しない。そのため再生医療には人工細胞外マトリックス(人工

スカフォールド)が必要であり、このための材料が生体材料、あるいはバイオマテリアルと呼ばれている^{3), 4)}。

スカフォールド用のバイオマテリアルには、コラーゲンのような天然高分子、乳酸高分子のような合成高分子、ハイドロキシアパタイトのような無機物質などがある。これらの素材から繊維状集合体やスポンジ体などの三次元多孔体スカフォールドが調製される。繊維状物質は、細胞が定着できる人工細胞外マトリックスの幾何構造の中でも増殖しやすい形状であると注目されており⁵⁾、近年、スカフォールド用のバイオマテリアルとしてカーボンナノチューブ(Carbon Nanotubes : CNTs)を用いる研究が行われ始めている。炭素材料を生体材料に応用する試みはグラファイトが高血栓性に優れていることから始まり⁶⁾、LTIカーボン(低温度等方性炭素材料)やC/Cコンポジット(炭素繊維強化炭素複合材料)を用いた人工心臓弁や人工歯根材⁷⁾などの応用開発が行われてきた。近年では、カーボンナノチューブ(Carbon Nanotubes ; CNTs)がもつ形状、ナノスペース、大きな比表面積などの特徴を活かし、生体分子観察用プローブティップ⁸⁾、遺伝子導入のベクター⁹⁾⁻¹⁶⁾、機能性糖鎖の吸着^{17), 18)}によるドラッグターゲティング材料、カテーテル材料¹⁹⁾、抗原検出センサー²⁰⁾、細胞培養担体(スカフォールド)²¹⁾⁻²⁷⁾などの生体医療材料、再生医療材料として注目されている。再生医療においてCNTsはスカフォールドとしての応用、つまり、生体外あるいは生体内で細胞を培養するための足場としてCNTsを利用するというもので、すで

✧ Corresponding Author, E-mail: hige@bucky1.kankyo.tohoku.ac.jp

(平成18年9月5日受理, 平成18年10月13日採択)

* 東北大学大学院環境科学研究所 : 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-20

* Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University : Aoba 6-6-20, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

** 北海道大学大学院歯学研究所 : 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

** Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University : Nishi 7, Kita 13, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

にいくつかの研究が行われている。Correa-Duarteらは垂直に配向したCNTsでさまざまな三次元構造をもったスカフォールドを調製し線維芽細胞培養実験を行った²⁴⁾。またHuらは異なる官能基を付加して表面電荷を変化させたCNTsを用いてスカフォールドを調製し、神経細胞培養実験を行った²⁶⁾。その結果、CNTsスカフォールドは細胞を育てる能力があることがわかった。さらにCNTsの電気特性を利用した電気刺激による神経細胞電気シグナル伝達の挙動の研究も行われている²⁷⁾。また、有機ナノチューブではあるが、Websterらはインプラント（歯根部の代替パーツや人工関節など）に用いられるチタンに有機ナノチューブを被覆させると、被覆していないものよりも約3割多く骨芽細胞が付着することを発見した²⁸⁾。これはナノメートルサイズの凹凸が細胞の付着を促進した結果であると報告している。さらに直径が約60nmのカーボンファイバー（Carbon Nanofiber：CNFs）上に選択的に細胞が成長することが報告されており、カーボン材料の細胞に対する親和性が明らかになった²⁹⁾。体内に埋め込まれるインプラントと元からある骨とがしっかりと結合するためには、骨芽細胞がインプラント表面に迅速に付着することが非常に重要であり、この結果はCNTsがインプラントと骨との結合を促進する可能性があることを示していると考えられる。現にCNTs上の骨芽細胞は増殖率が高いことが報告されている³⁰⁾。これから到来する高齢化社会では、人工関節などのインプラントが大量に必要になると予想され、生体に迅速に結合するインプラントの必要性はより大きくなると思われる。

CNTsはその特異な物性から、分子電子デバイスや高感度センサーなどのナノテクノロジー分野に大きな変革をもたらす潜在能力をもつ新素材であり、生産量も拡大しつつある。そこで、CNTsが人体や生物の体内に暴露される機会が増加する前に、あるいはCNTsを生体材料として応用する前に、これらが人体に取り込まれたときの生体反応をより詳しく調べる必要性が生じている^{31)~35)}。CNTsが人体に取り込まれる可能性は大きく2つに分類される。1つはCNTsを扱う作業員や研究者であり、もう1つはCNTsを生体材料として使用される患者である。両者に共通していることは、生体外のもの（CNTs）が細胞と相互作用する機会が生じることである。一般的に細胞毒性を引き起こす要素は、金属溶出^{36), 37)}、表面官能基^{38)~40)}、比表面積、サイズ効果^{41)~46)}、粒子溶解度⁴⁷⁾が知られている。金属溶出は金属表面が体内のpHにより腐食し、イオンとして溶出することによって細胞に影響を与える。細胞や組織内での金属腐食は最も知られた細胞毒性を引き起こす要素であり、金属のイオン化傾向に依存するとされる。インプラント材料であるTi合金（Ti-6Al-4V）のAlはしばしば溶出し⁴⁸⁾、骨の成長阻害因子やアルツハイマー病の発症因子の原因として挙げられており⁴⁹⁾、またVの溶出は強い細胞毒性をもつ元素である。生体親和性をもたせるために、材料の表面修飾は一般的な処理であるが、官能基の種類により毒性を示すことが報告されている。例えば、細胞標識として注目されているCdSe量子ドットの表面改質による細胞毒性評価では、COOH/OHが混在した表面コーティングは毒性を示さず、COOHのみの表面修飾は毒性を示すと報

告されている³⁹⁾。比表面積の効果は、比表面積が大きければ大きいほど、材料と細胞との接触する面積は大きくなり、材料と細胞の相互作用が大きくなる細胞毒性を左右する要因となる。同時に粒子のサイズ、形状も細胞毒性に影響を与え、例えば、生体界面活性剤で被覆された金粒子は生体親和性があるが⁴⁰⁾、小さいサイズの金ナノ粒子は電子状態の変化から、被覆された生体界面活性剤が外れ、DNAに吸着して安定化し、その吸着されたDNAは正常に働かず、毒性を引き起こすと報告されている⁴⁶⁾。また、ナノ粒子の生体影響を考えるとときに粒径がきわめて小さくなると、ナノ粒子表面の物理・化学的性質と細胞との相互作用、ナノ粒子の体内挙動が問題となってくる。一般に生体親和性の高いテフロン⁴¹⁾やチタン^{42), 45)}もナノサイズになると肺毒性、細胞毒性を示すことが知られている。一方、細胞毒性には形状効果もあり、アスベストは大きな縦横比をもつ繊維状の物質で悪性中皮腫や肺癌を発現する物質である⁵⁰⁾。1970年代に米国のStanton⁵¹⁾と西ドイツのPott⁵²⁾は独自に繊維状形態に着目し、サイズ（長さ、直径）を調製したさまざまな物質をラットやマウスの胸腔、腹腔に注入し長期間飼育後、胸腔、腹腔の病変や悪性中皮腫の発現率を調べている。その結果、生体内で耐久性があり、細くて長い繊維状物質は化学組成や結晶構造に関係なく発ガン性をもつことを示し、特に幅0.25 μm 以下で、長さ8.0 μm 以上の繊維の中皮腫発現率が最も高いことを見出している。Hartらもアスベストや人工ガラス状ファイバーの長さ、直径、組成などの要因について詳細に報告している⁵³⁾。

単層カーボンナノチューブ（Single-Walled Carbon Nanotubes；SWCNTs）、多層カーボンナノチューブ（Multi-Walled Carbon Nanotubes；MWCNTs）は（高純度グラファイト棒を陽極としてアーク放電法により合成される陰極堆積物中の多層カーボンナノチューブを除く）すべて触媒金属を用いることにより合成される。現在ではその触媒金属は、Fe、Co、Ni、Y、La、Ce、YNi、FeNi、CoNi、CoMoなどと単体金属から合金まで数多く知られている。したがって、金属触媒を用いて合成されるため、合成直後のカーボンナノチューブ（as-grown CNTs）には金属粒子が含まれている。また、CNTsは応用に応じてさまざまな機能性官能基を化学修飾することが可能であり、比表面積も大きい。さらに繊維状であり、直径、長さ、形態もさまざまである。このように細胞毒性を引き起こすと考えられる要因を所有するCNTsの細胞毒性を調べることは必要不可欠である。ここでは、現時点で報告されているCNTsの安全性についてまとめ、著者らのグループが行った「高純度多層カーボンナノチューブの長さに対する細胞毒性評価」について記述する。

2. カーボンナノチューブの安全性評価

2001年、Huczkoらは⁵⁴⁾未精製のCNTs（アーク放電法により合成；金属触媒Co/Ni、SWCNTsあるいはMWCNTsなのかは記述なし）25mgを少量のtween界面活性剤を加えた0.5mLのリン酸緩衝生理食塩水に分散させ、モルモットの気管内に注入し、肺毒性試験を行っている（コントロールはCNTsなしの溶液）。気

管支肺胞洗浄液試験からの炎症性細胞数はコントロール（比較対照サンプル）との違いが観察されず、特に毒性はないと報告している。しかし、2005年彼らは⁵⁵⁾再度、未精製MWCNTs（CVD法、アーク放電法）、販売しているMWCNTs（CVD法；NanoLab社、Pyrograf社、昭和電工）をモルモットの気管内に注入し、気管支肺胞洗浄液試験、肺抵抗試験、組織学的顕微鏡観察を3カ月後に行った。Pyrograf社以外のMWCNTsは気管支肺胞洗浄液に肺胞マクロファージを確認している。また、異常な肺抵抗を示し、組織学的観察からは多種の損傷が観察されたと報告しており、2001年のデータとは逆の結果を示している。

Warheitらは⁵⁶⁾、1.0% tween 界面活性剤の添加された生理食塩水に未精製のSWCNTs（レーザー蒸発法により合成；金属触媒Co/Ni）を1.0mg/kgと5.0mg/kgとなるように調製し、ラットの気管内に注入し、気管支肺胞洗浄液試験、細胞増殖アッセイ、組織学的観察を24時間後、1週間後、1カ月間後、3カ月間後に行っている。気管支肺胞洗浄液試験、細胞増殖アッセイから、一時的な炎症を観察し、組織学的観察からは多発性肉芽腫を観察しているが、濃度依存性がなく、進行的な炎症ではないと報告している。

Lamらは⁵⁷⁾、マウスの血清50μLに0.1mg、0.5mgの未精製SWCNTs（HiPco）、精製SWCNTs（HiPco）（CVD法の1種であるHiPco法により合成；金属触媒Fe）、未精製SWCNTs（アーク放電法により合成；金属触媒Ni）を調製し、マウスの気管内に注入し、組織学的観察を1週間後、3カ月間後に観察した。組織学的観察から、すべてのサンプルは濃度依存性を示し、肺組織損傷が観察されている。特にNi触媒で合成された未精製SWCNTsは死亡率が高いと報告している。これは触媒金属Niの影響が現れていると考えられる。

Mullerらは⁵⁸⁾、精製MWCNTsと精製MWCNTsの粉砕物を調製し、0.5mg、2.0mg、5.0mgをラットの気管内に注入し、気管支肺胞洗浄液試験、生体内滞留性、組織学的観察を2カ月後に行っている。どちらのCNTsも濃度依存性を示し、炎症と肉芽腫の形成が観察されている。炎症はカーボンブラックより強く、アスベストより弱く、どちらのCNTsも60日後でも肺に滞留しているが、精製MWCNTsのほうが精製MWCNTsの粉砕物と比較して滞留物として残りやすいことを指摘している。

Huczkoらは⁵⁹⁾、未精製MWCNTsの水溶液を飽和させたフィルターペーパーを皮膚に接触させてアレルギー反応を試験した（パッチ試験）。接触時間は96時間で、被験者はアレルギーの感受性が高い40人の志願者で行っている。さらに、未精製MWCNTsの水溶液をウサギの目に滴下する眼滴試験による炎症性を調べている。どちらのテストもMWCNTsの混入しているコントロールと比較して違いが観察されず、毒性がないと結論している。

Shvedovaらは⁶⁰⁾、不死化したヒト表皮ケラチノサイト細胞株HaCaT細胞に関する未精製SWCNTs（CVD法、触媒金属；Fe）の影響を調べている。SWCNTsは培養液に0.06、0.12、0.24mg/mLの濃度に調製し、ヒト由来表皮細胞と混合して18時間培養した。その結果、ラジカル種と過酸化物が増加し、同時に細胞生存率の減少、細胞組織の炎症を確認している。しかし、これらの影響は

高濃度金属触媒Feの影響であると結論づけている。

Monteiro-Riviereらは⁶¹⁾、ヒト表皮細胞に関する竹の子構造をもつ精製MWCNTs（CVD法）の影響を調べている。精製したMWCNTsは培養液に0.1、0.2、0.4mg/mLの濃度に調製し、ヒト由来表皮細胞と混合し24時間培養した。MWCNTsはサイトカイン（細胞の分泌物）であるIL-8（インターロイキン8；急性期炎症反応における好中球遊走、活性化にかかわる本質的な因子）を誘発し、細胞生存率が減少することを時間依存性、濃度依存性試験から確認している。透過型電子顕微鏡（TEM）から細胞内にMWCNTsが存在することも観察している。この精製MWCNTsの試験から、ヒト表皮細胞に対してMWCNTsは毒性を示すと考察している。

Mullerらは⁵⁸⁾、精製MWCNTsと精製MWCNTsの粉砕物を調製し、20、50、100μg/mLの濃度を腹膜マクロファージ（マクロファージ；異物を貪食する貪食細胞）を用いて2カ月間生体外試験（*in vitro*）を行っている。細胞毒性は乳酸脱水素酵素放出（培養24時間後）、炎症性はTNF-αのmRNA発現（培養6時間後）を測定して評価している。彼らは精製MWCNTsの粉砕物はアスベストやカーボンブラックと同様な濃度依存性を示す毒性があると報告している。また、精製MWCNTsにおけるTNF-αのmRNA発現や炎症は、精製MWCNTsの粉砕物のものに比べると低く、重大な毒性を示さないと言及している。また彼らは、過酸化水素水やギ酸を加えた精製MWCNTs分散液は活性酸素やラジカル種を発生させないこと、多くの水酸基活性ラジカルや活性酸素ラジカルを補足するという“スキベンジャー効果”があることを見出しており⁶²⁾、逆にラジカル種を補足する効果により、免疫系のバランスを崩す可能性が起り得ることを指摘している。

Bottiniらは⁶³⁾、未精製MWCNTs（CVD法；NanoLab社製）と親水処理した精製MWCNTsをそれぞれ40μg/mL、400μg/mLの濃度に調製し、ヒトT細胞の細胞生存率、細胞増殖率、細胞死亡率を測定している。彼らのCNTs毒性の投与量評価によれば、40μg/mL（細胞1つ当たり1.0ngの量）以下のCNTsは毒性がなく、生体医学応用に使用可能なCNTs投与量であると推測しており、その毒性は物理的な要素（形状、直径、長さ、吸着特性）に依存することも言及している。

上記からもわかるようにさまざまなCNTsをさまざまな処理を施して毒性試験に使用している。同時に細胞も多種多様であることから、得られるデータも十人十色である。本来のCNTsの毒性を評価するにあたり、上記の論文では細胞毒性にかかわる4つの基礎的な要因（金属含有濃度、表面官能基、サイズと形態、比表面積）に関するCNTsの詳細な分析が欠けている。そのため、現時点ではナノチューブの毒性がどのような要因から引き起こされているか議論できないのが現状である。しかしながら、これまでの報告からも明らかにas-grown CNTsは、細胞に対する金属溶出の影響があるため、毒性を引き起こしている。したがって、生体材料などへCNTsを応用するには、十分に触媒金属を除去したものでなければならないことは必須であると言える。

一方、CNTsが細胞毒性を示す報告ばかりではない。Koyamaらは⁶⁴⁾、素性の知れた4つの異なるCNTs（SWCNTs、直径の異なる

るMWCNTs, カップ型MWCNTs)を末梢血中T細胞のCD4⁺とCD8⁺の測定, また皮下細胞に埋入したときの周囲軟組織の炎症反応(3カ月間)を病理組織学的に調べているが, アスベストと比較すると格段に低い細胞毒性を示している。

Chlopekらは⁶⁵⁾, 高純度MWCNTsに対する線維芽細胞, 骨芽細胞, オステオカルシンの細胞生存率とIL-6, 活性酸素放出量などのサイトカイン分泌量を調べている。彼らのデータもわずかなサイトカイン量の増加が観測されているが, 医療に使われているポリサルフォンと同様に生体親和性材料であると報告している。

Sayesらは⁶⁶⁾, *in vitro*でヒト由来真皮線維芽細胞を使用し, SWCNTsの細胞毒性における官能基の化学修飾の影響を調べている。SWCNTsはSWCNT-phenyl-SO₃H, SWCNT-phenyl-SO₃Na (SWCNTsに対する-phenyl-SO₃Xの化学修飾度はC/CF=18, 41, 80。C/CFは化学修飾された官能基に対するSWCNTsの割合を示す。数値が低いほど化学修飾度が高い), SWCNT-phenyl-(COOH)₂ (SWCNTsに対する-phenyl-(COOH)₂の修飾度はC/CF=23), 1.0%プルロニックF108被覆したSWCNTsを使用している。彼らはSWCNTsの化学修飾度が増加すると, 界面活性剤で被覆したSWCNTsよりも大幅に細胞毒性が低いことを見出ししている。化学修飾SWCNTsの修飾度に対する細胞生存率は50%未満にはならないと報告している。

Biancoらも^{67), 68)}, 化学修飾したSWCNTs, MWCNTsの生体親和性を報告している。¹¹¹Inラベルしたジエチレントリアミン五酢酸を化学修飾したSWCNTsを静脈内投与し, ガンマシンチグラフィで観察している。透過型電子顕微鏡で排出された尿中にSWCNTs, MWCNTsが観察されたことから, 化学修飾したSWCNTs, MWCNTsは肝臓や脾臓などの網内系臓器には蓄積せず, 血液循環から腎排泄を通り, 尿として排出されることを推定している⁶⁷⁾。一方, *in vitro*において, 4つの化学修飾したSWCNTsをマクロファージ, Bリンパ球(B細胞), Tリンパ球(T細胞)に取り込まれているが, 細胞生存率には影響はなかった。溶解度の高い化学修飾したSWCNTsはそれぞれの免疫系細胞の機能は正常に保ったままであり, やや溶解度の低い化学修飾したSWCNTsは, マクロファージによる炎症性サイトカインの分泌を引き起こしているものの, リンパ球の機能が保たれていることを確認している⁶⁸⁾。

Chenらは⁶⁹⁾, CNTs表面を糖重合体でコーティングさせることにより生体親和性を高め, カーボンナノチューブに基づいた生体組織工学スカフォールドの作製を試みている。

3. 高純度多層カーボンナノチューブの細胞毒性に関する長さの影響

CNTsは直径数ナノメートル, 長さ数~数十マイクロメートルの非常に大きな縦横比をもった物質であり, カーボンファイバーとナノ粒子の中間のサイズである。CNTsの細胞に及ぼす影響について報告されてきているが, 高純度に精製された長さの異なるCNTsが細胞に与える影響を調べた研究例はこれまでに報告されていなかった。本項では著者のグループが行った「高純度多層カ

ーボンナノチューブの細胞毒性に関する長さの影響」について述べる。

一般的に細胞毒性の調べ方にはいくつかの方法がある。第1は対象物を加えた状態で細胞を培養し, 生存している細胞数を顕微鏡で数える方法である。この方法は確実ではあるが, 手数がかかるため, 通常は生化学的方法で代用する。細胞が生きていれば細胞本来の代謝作用によって外部の物質を取り込んで, 細胞内の酵素作用によって化学変化を与える。それを利用して代謝されやすい色素を培地に加えて, 吸収(または蛍光)スペクトルの変化から細胞活性を求める方法である。さらに高度な方法として, 細胞が刺激を受けたときに放出する細胞間のシグナル伝達物質などを測定する方法もあり, この方法では細胞が破壊されるような強い毒性だけでなく, その前段階の刺激性を評価することも可能である。上記のいくつかの検証方法を用いてMWCNTsの長さの違いが細胞にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために, 厳密に高純度精製された長さの異なるMWCNTsのヒト由来マクロファージ系細胞株であるTHP-1細胞に及ぼす影響(*in vitro*)と, ラット胸部皮下細胞に埋入したときの周囲軟組織の炎症反応(*in vivo*)を病理組織学的に調べた⁷⁰⁾。

3.1 材料と実験方法

合成直後のMWCNTs (NanoLab社製, 米国) 100mgを大気中, 773K, 90分間燃焼酸化させた後, 6M-HCL 1.0 Lに入れ, 333Kで12時間静置させた。その後, 3M-NaOH 1.0 Lに入れ, アルミナを除去した。ろ液が中性になるまで熱水でろ過して洗い, ろ過物を大気中, 333Kで24時間乾燥させた。精製したMWCNTs 100mgを濃硫酸(95%):濃硝酸(60%)=75mL:25mLの混合液100mLに入れ, 5時間超音波照射(200W, 39kHz)を行った⁷¹⁾。その後, 切断処理したMWCNTs 10mgをエタノール1000mLに分散させ, 37 μ mのメッシュフィルターで凝集しているナノチューブをろ過した。次にボアサイズ2.0, 1.2, 0.8, 0.4 μ mのポリカーボネートメンブランフィルターの順番でろ過を行い, それぞれのフィルター上のケーキを真空中, 313K, 48時間以上乾燥させた。この処理を3バッチ行った。MWCNTsによるTHP-1細胞の活性化は*in vitro*で以下の手順で行った。U型の96穴のマイクロプレートを用いて, その1ウェルに10%ヒト由来の血清を含むRPMI 1640培地200 μ L中に 5.0×10^5 個のTHP-1細胞を懸濁させ, MWCNTs懸濁液5ng/mL, 50ng/mL, 500ng/mLの濃度でそれぞれ16時間刺激した。遠心により上澄みを集め, ELISA法でサイトカインである腫瘍壊死因子量(Tumor Necrosis Factor-alpha: TNF- α)を測定した。周囲軟組織の炎症反応(*in vivo*)は以下の方法で行った。粉体サンプルを8週齢雄性ウィスター系ラットの胸部皮下に埋入し, 1, 4週後に灌流固定後, 摘出し光学顕微鏡および透過型顕微鏡(TEM)で観察した。(詳しい細胞毒性実験の記述は文献70, 72を参照)

3.2 高純度多層カーボンナノチューブのキャラクターゼーション

MWCNTsは, NanoLab社から購入したものを使用した。形態は曲がりくねった繊維状であり, 外径10~20nm, 長さ1.0~3.0 μ m

Fig.1 SEM (left) and size-distribution (right) of 220-CNTs (a) and 825-CNTs (b). (c) TEM photographs of 220-CNTs. (d) CNT concentration versus time plots for both 220-CNTs and 825-CNTs dispersed in water and PBS; 220-CNTs in water (○), 825-CNTs in water (●), 220-CNTs in PBS (□) and 825-CNTs in PBS (■), respectively.

と広範囲にわたって分布している。MWCNTs中の金属濃度は誘導結合高周波プラズマ分光分析 (ICP-OES) 測定から見積った。ICP-OES測定では、測定試料を溶液としてアルゴンプラズマ中に導入するため、固体試料を酸などで分解して溶液とする必要があり、試料の組成を損失することなくまた、いかに効率良く溶液化できるかが問題になる。CNTs試料の溶液化法として、酸分解法、灰化/酸分解法、灰化/融解法、直接融解法、マイクロウェーブ加圧分解法の検討を行った結果、操作性、定量値精度に優れているマイクロウェーブ加圧分解法により、CNTs試料の溶液化した⁷³⁾。CNTs中にMoが含まれている場合には、溶液化方法に注意しなければならない。灰化/酸分解法、灰化/融解法での灰化時にMoの一部がMoO₃ (融点: 1068K) となって昇華するため、Moの濃度が低く見積られてしまう。近年ではMo系金属触媒によるナノチューブ合成法が増えており、購入も可能となっているため、Mo金属濃度の見積もりには注意されたい。今回使用した精製前のサンプルの元素組成はC: 88.50wt %, Al: 5.73wt %, Fe:

4.43wt %, Mo: 1.27wt %, Cr: 0.07wt %であった。このAlはAl₂O₃の微粒子であることをTEM-EDXにより確認した。これに対して精製したサンプルの元素組成はC: 98.17wt %, Al: 1.41wt %, Fe: 0.26wt %, Mo: 0.01wt %, Cr: 0.15wt %であり、高純度であることがわかった⁷³⁾。Crの割合が高くなっているのは、ナノチューブ切断処理の硝酸により、Cr内包炭素カプセルの炭素が湿式酸化され、内包金属のCrの表面が不動態を形成したためと考えられる。残存している金属はグラファイトカプセルで被覆されていることを精製後のTEM写真から確認している。**Fig.1** (a), (b) は強酸処理後のMWCNTsをポアサイズ2.0, 0.4μmのメンブランフィルターでろ過したときのケーキのSEM写真(左)である。右図はそれぞれのポアサイズで分離したMWCNTsの長さ分布である。MWCNTsの平均長さは825nm, 220nmであった(以後、220nmのMWCNTsを220-CNTs, 825nmのMWCNTsを825-CNTsとする)。**Fig.1** (c) は平均長さ220nmのMWCNTsのTEM写真である。MWCNTsの切断処理により、外側層がダメ

Fig.2 IR spectra of 220-CNTs (bottom) and 825-CNTs (top).

ージを受けていることがわかる。Fig.1 (d) は220-CNTsと825-CNTsの蒸留水中とリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の時間に対する濃度変化を示した。蒸留水中では、どちらのチューブもよく分散しており、沈殿は観察されなかった。一方、PBS中では、825-CNTsのほうが早期に沈殿を起こすことがわかった。Fig.2は220-CNTsと825-CNTsの赤外線吸収スペクトルである。1584 cm^{-1} は芳香族のC=Cに由来する伸縮振動で、1398 cm^{-1} と1240 cm^{-1} はカルボキシル基のC-O伸縮振動とO-Hの変角振動に相当する。これらのバンドはカルボキシル基のダイマー (2量体) を形成することで高波数に現れることが明らかにされている。また、1398 cm^{-1} と1550 cm^{-1} のショルダーピークは伸縮振動のカルボキシルアニオンと推定される。3120 cm^{-1} と3450 cm^{-1} はカルボキシル基のO-H伸縮振動である。このように $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ 溶液処理によりカーボンナノチューブにはカルボキシル基が付加していることが推定される。

3.3 In vitro試験

マクロファージ系THP-1細胞は異物と認識すると、活性化され、炎症性サイトカインのTNF- α を生産する。Fig.3は220-CNTsと825-CNTsのTHP-1細胞の活性化されて生産したTNF- α 量を表した棒グラフである。参照サンプルである微生物由来のPathgen-Associated Molecular Pattern (PAMP) をもつリポペプチドはマクロファージを活性化し、TNF- α を生産していることから、細胞に異物として認識されていることがわかる。一方、220-CNTsと825-CNTsはマクロファージの活性化能を発現しているが、その

Fig.3 Induction of THP-1 cells by 220-CNTs and 825-CNTs. The diacylated lipopeptide FSL-1 was used as a positive control.

活性は非常に低いことがわかった。それぞれのサイズ分離したMWCNTsの濃度依存性では、濃度が高くなるとTNF- α が増加する濃度依存性を示しているが、その量は非常に低い。また、濃度一定に対するMWCNTsのサイズ依存性では、TNF- α の量がほとんど変化せず、リポペプチドのTNF- α 量の約1/45～1/60倍であった。細胞毒性の要素には、異物の表面積、官能基が関係すると言われている。使用した220-CNTsと825-CNTsの比表面積は300 m^2/g 、320 m^2/g と差がなく、また、MWCNTsの表面はカルボキシル基で修飾されているので (ただし、それぞれのチューブに修飾されているカルボキシル基の量は測定していない)、細胞への親和性が十分高いと考えられる。これらの要素はナノチューブの長さが異なることによる大きな変化はなく、このTHP-1細胞の*in vitro*試験では、220-CNTsと825-CNTsのサイズの影響が明確に現れなかった。

3.4 In vivo試験

3.4.1 平均長さ220nmのMWCNTs

埋入1週間後では220-CNTsの多くがマクロファージや線維芽細胞内に観察され、大きな集塊周囲には異物巨細胞が観察されたが、強い炎症反応は観察されなかった (Fig.4a, 光学顕微鏡写真)。TEM観察において、220-CNTsはマクロファージ中のライソゾーム内に観察され、短いMWCNTsが凝集している様子が確認できた。ナノチューブの形態に大きな変化は認められなかった。4週間後でも220-CNTsの多くは1週間後のものと同様で、特に大きな変化は認められなかった (Fig.4c, Fig.5a, c)。

3.4.2 平均長さ825nmのMWCNTs

埋入1週間後の825-CNTsの多くは、ナノチューブ周囲に軽度の炎症反応を伴う肉芽組織が観察された。これは220-CNTsと比較するとやや強い炎症反応を示している。一部はマクロファージに貪食されているものの、ほとんど多くは細胞質内に凝集していた (Fig.4b, 光学顕微鏡写真)。TEM観察において、多くの825-CNTsは、絡み合った凝集状態が観察され、膜構造で覆われず、細胞質内に集塊していた。埋入4週間後では、いわゆる肉芽腫性炎の

状態を呈しており、ナノチューブの周囲にはマクロファージや異物巨細胞などの貪食細胞が数多く観察される (Fig.4d, 光学顕微鏡写真)。一部はマクロファージに貪食されていたが、多くは細

Fig.4 Histology of 220-CNTs and 825-CNTs implanted in the subcutaneous tissue. 1 week : Clusters of both of 220-CNTs and 825-CNTs were surrounded by granulation tissue. (a) Many of the 220-CNTs were enveloped by macrophages (arrows). (b) Some of the 825-CNTs were observed in the intercellular space (arrows), while others were observed in macrophages (white arrows). 4 weeks : (c) Most of the 220-CNTs were observed in macrophages (arrows) and fibroblasts (white arrows). (d) There was a negligible difference in the degree of inflammation around 825-CNTs 4 weeks following surgery, compared to 1 week. All scale bars are 10 μ m.

胞質内に存在し、膜構造は認められない (Fig.5b, d, e)。今回の実験では、1本1本のMWCNTはマクロファージが貪食され、細胞内に取り込まれる長さではあるが、試験方法がMWCNTsのパウダーで埋入するため、埋入時からすでにMWCNTsは凝集状態である。生理活性水などのナトリウムイオンやカリウムイオンが溶解している電解質では、カルボキシル基をもつナノチューブは凝集する特性をもつ⁷⁴⁾。また、PBSでは、825-CNTsのほうが220-CNTsより速く凝集する効果がある (Fig.1d)。したがって、凝集状態で導入された825-CNTsは軟組織内で分散することが困難で、マクロファージに貪食されず、細胞間隙に長期にわたり留まり、肉芽腫性炎を引き起こしたと考えられる。ところが、220-CNTsの4週間後のTEM像でも確認できるように、ナノチューブが凝集体から解けて、ライソゾームに取り込まれているTEM像が観察されている。220-CNTsはPBS中でも、825-CNTsより分散性が良いため、軟組織内での分散が可能であったため、マクロファージに容易に貪食されたと考えられ、長さのサイズ効果が現れている。さらに、この原因は825-CNTsの凝集効果に加えて、ナノチューブの形態の影響もあると考えられる。220-CNTsは明らかに真っすぐであるが、825-CNTsは曲がりくねっており、ナノチューブ同士が解れ難い形態をしているからである。いずれにせよ、今回の実験では、カーボンナノチューブは細胞が死滅するような毒性の高い物質ではないことを確認した。また、長いナノチューブが凝集することでマクロファージに貪食されず、細胞質に留まることで肉芽腫炎など軽度の炎症を引き起こすことが確認された。

まとめると、*in vitro*による異物認識反応試験から、THP-1細胞の活性化が非常に低く、TNF- α が生産されにくいことから、220nm

Fig.5 TEM photographs of 220-CNTs (a) and 825-CNTs (b) implanted in the subcutaneous tissue 4 weeks following surgery. **Fig.5c** is a high magnification TEM photograph at the black square part of **Fig.5a**. **Figs.5d** and **e** are high magnification TEM photographs at the black dashed square and white square part of **Fig.5b**. Most of the 220-CNTs (white arrowheads in **Figs.5a** and **c**) were observed in lysosomes (white arrows in **Figs.5a** and **c**). Aggregation of 825-CNTs (arrows in **Figs.5b** and **e**) was observed in the cytoplasm and was not covered by membrane. Typical structure of CNTs (white arrowheads in **Figs.5b** and **d**) was observed in the cytoplasm. All scale bars are 300 nm.

から825nmの範囲のナノチューブ長さでは細胞機能を害さない、生体適合性に優れた水溶性MWCNTsであることを示した。*in vivo*による周囲組織反応では、220-CNTsは細胞内に侵入し、サイズの効果が観察された。また、組織細胞は220nmより825nmのCNTsのほうが肉芽腫性炎を引き起こしたが、その炎症反応は軽度で深刻なものではなく、生体親和性物質であると考えられる。本研究の結果から、カーボンナノチューブでは細胞毒性にかかわる4つのファクター（金属含有濃度、表面官能基、サイズと形態、比表面積）以外にも、生体内での凝集状態も重要な要因であることを示した。上記のMWCNTsを用いたスカフォールドは、ヒト骨肉腫由来の骨芽様細胞（Saos2）を非常によく成長させ、人工細胞外マトリックスとしても非常に興味深い特性を示している^{75), 76)}。

4. まとめ

さまざまなCNTsをさまざまな処理を施して毒性試験を行うことは、データとして蓄積され有益なことではあるが、使用するCNTsの詳細な情報を示さない、もしくはCNTsのキャラクターゼーションを行わないのは問題である。例えば、Mullerら⁵⁸⁾による「精製したMWCNTsの粉砕物」は瑪瑙ボールミルでサンプルを調製している。筆者の経験では、回転速度にも依存するが粉砕ポットとボールの材質が不純物としてサンプルに混入してしまうので、彼らのデータは瑪瑙の不純物の影響が現れているのではないかと疑いが生じる。瑪瑙は互層した縞状の微結晶質石英の集合体である。近年では、結晶質シリカは高い発ガン性物質として位置づけられている⁷⁷⁾。彼らの論文では粉砕後のMWCNTsのキャラクターゼーションを記述していないため、粉砕で混入した微結晶シリカの毒性を測定している可能性も考えられる。重要であるのは、使用するCNTsの詳細な情報を調べたうえでの毒性評価を行うことである。また、使用する細胞にも異物に対する感受性の高い細胞もあり、細胞によってCNTsの細胞毒性反応は十分異なる可能性がある。さらに、本来のCNTsの毒性を評価するにあたり、細胞毒性にかかわる4つのファクター（金属含有濃度、表面官能基、サイズと形態、比表面積）とナノチューブの凝集状態に関するCNTsの詳細な分析が欠けているため、現時点ではナノチューブに毒性があるのか、毒性があるのであれば、どのような要因から引き起こされているかなどの議論は困難である。最近、Wörle-Knirschらは⁷⁸⁾、SWCNTsがMTTアッセイにあるテトラゾリウム塩と相互作用を示す知見を得ており、従来の細胞生存率の毒性試験方法がナノ粒子、カーボンナノチューブに適切な試験方法であるのか考えさせるデータを提示していると同時に、規格化されたカーボンナノチューブの提供により、出発物の統一サンプルによる細胞毒性評価を提案している。現段階では、ある毒性試験を行うことによって安全性を評価できるという決定的な方法はないが、時間を必要とする*in vivo*試験は有効な毒性評価であると考えられる。今後、産業におけるカーボンナノチューブが発展されるためにも、カーボンナノチューブの細胞毒性が正しく評価されることを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は厚生科研費（課題H18-化学一般-006）、財団法人新井科学技術振興財団助成金、および東北大学学際科学国際高等研究センターのセンター共同研究によるものである。

文 献

- 1) R. Langer and J. P. Vacanti, *Science* **260** (1993) 920.
- 2) M. Yamato and T. Okano, *Materials Today* **7** (2004) 42.
- 3) 浅島 誠, 吉田博夫, 上田 実 編: “再生医学と生命科学—生殖工学・幹細胞工学・組織工学” (2000) 共立出版.
- 4) 中林宜男, 石原一彦, 岩崎泰彦: “バイオマテリアル” (1999) コロナ社.
- 5) 久保木芳徳, 滝田裕子, 吉本良太, 賀米 亨, ティッシュエンジニアリング 2006 (2006) 24.
- 6) V. L. Gott, J. D. Whiffen and R. C. Dutton, *Science* **142** (1963) 1297.
- 7) J. C. Bokros, *Carbon* **15** (1977) 355.
- 8) A. T. Woolley, C. Guillemette, C. L. Cheung, D. E. Housman and C. M. Lieber, *Nat. Biotechnol.* **18** (2000) 760.
- 9) A. Bianco and M. Prato, *Adv. Mater.* **15** (2003) 1765.
- 10) D. Pantarotto, J. -P. Briand, M. Prato and A. Bianco, *Chem. Comm.* (2004) 16.
- 11) D. Pantarotto, C. D. Partidos, J. Hoebeke, F. Brown, E. Kramer, J. P. Briand, S. Muller, M. Prato and A. Bianco, *Chem. Biol.* **10** (2003) 961.
- 12) Q. Lu, J. M. Moore, G. Huang, A. S. Mount, A. M. Rao, L. L. Larcom and P. C. Ke, *Nano Lett.* **4** (2004) 2479.
- 13) T. Murakami, K. Ajima, J. Miyawaki, M. Yudasaka, S. Iijima and K. Shiba, *Mole. Pharm.* **1** (2004) 399.
- 14) A. Bianco, K. Kostarelos, C. D. Partidos and M. Prato, *Chem. Comm.* (2005) 571.
- 15) D. Pantarotto, R. Singh, D. McCarthy, M. Erhardt, J. P. Briand, M. Prato, K. Kostarelos and A. Bianco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 5242.
- 16) Q. Lu, J. M. Moore, G. Huang, A. S. Mount, A. M. Rao, L. L. Larcom and P. C. Ke, *Nano Lett.* **4** (2004) 2473.
- 17) B. Fugetsu, S. Satoh, T. Shiba, T. Mizutani, Y. -B. Lin, N. Terui, Y. Nodasaka, K. Sasa, K. Shimizu, T. Akasaka, M. Shindoh, K. -I. Shibata, A. Yokoyama, M. Mori, K. Tanaka, Y. Sato, K. Tohji, S. Tanaka, N. Nishi and F. Watari, *Environ. Sci. Technol.* **38** (2004) 6890.
- 18) F. Balavoine, P. Schultz, C. Richard, V. Mallouh, T. W. Ebbesen and C. Mioskowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 1912.
- 19) M. Endo, S. Koyama, Y. Matsuda, T. Hayashi and Y. -A. Kim, *Nano Lett.* **5** (2005) 101.
- 20) C. Li, M. Curreli, H. Lin, B. Lei, F. N. Ishikawa, R. Datar, R. J. Cote, M. E. Thompson and C. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 12484.
- 21) M. P. Mattson, R. C. Haddon and A. M. Rao, *J. Mol. Neurosci.* **14** (2000) 175.
- 22) P. R. Supronowicz, P. M. Ajayan, K. R. Ullmann, B. P. Arulanandam, D. W. Metzger and R. Bizios, *J. Biomed. Mater. Res.* **59** (2002) 499.
- 23) H. Hu, Y. Ni, V. Montana, R. C. Haddon and V. Parpura, *Nano Lett.* **4** (2004) 507.
- 24) M. A. Correa-Duarte, N. Wagner, J. Rojas-Chapana, C. Morsczech, M. Thie and M. Giersig, *Nano Lett.* **4** (2004) 2233.
- 25) J. H. Rouse, P. T. Lillehei, J. Sanderson and E. J. Siochi, *Chem. Mater.* **16** (2004) 3904.
- 26) H. Hu, Y. Ni, S. K. Mandal, V. Montana, B. Zhao, R. C. Haddon and V. Parpura, *J. Phys. Chem. B.* **109** (2005) 4285.
- 27) V. Lovat, D. Pantarotto, L. Lagostena, B. Cacciari, M. Grandolfo, M. Righi, G. Spalluto, M. Prato and L. Ballerini, *Nano Lett.* **5** (2005) 1107.
- 28) A. L. Chum, J. G. Moralez, H. Fennoro and T. J. Webster, *Nanotechnology*

- 15 (2004) S234.
- 29) D. Khang, M. Sato and T. J. Webster, *Reviews on Advanced Materials Science* **10** (2005) 205.
- 30) L. P. Zanello, B. Zhou, H. Hu and R. C. Haddon, *Nano Lett.* **6** (2006) 562.
- 31) R. F. Service, *Science* **281** (1998) 941.
- 32) R. F. Service, *Science* **300** (2003) 243.
- 33) P. H. M. Hoet, A. Nemmar and B. Nemery, *Nat. Biotechnol.* **22** (2004) 19.
- 34) V. L. Colvin, *Nat. Biotechnol.* **21** (2004) 1166.
- 35) A. Nel, T. Xia, L. Madler and N. Li, *Science* **311** (2006) 622.
- 36) A. McNamara and D. F. Williams, *Biomaterials* **2** (1981) 33.
- 37) M. Uo, F. Watari, A. Yokoyama, H. Matsuno and T. Kawasaki, *Biomaterials* **22** (2001) 677.
- 38) B. Fubini, *Environ. Health. Perspect.* **105** (1997) 1013.
- 39) A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki and K. Yamamoto, *Nano Lett.* **4** (2004) 2163.
- 40) E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy and M. D. Wyatt, *Small* **1** (2005) 325.
- 41) C. J. Johnston, J. N. Finkelstein, P. Mercer, N. Corson, R. Gelein and G. Oberdörster, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **168** (2000) 208.
- 42) K. Tamura, N. Takashi, R. Kumazawa, F. Watari and Y. Totsuka, *Mater. Trans.* **43** (2002) 3052.
- 43) J. E. Sanders, C. E. Stiles and C. L. Hayes, *J. Biomed. Mater. Res.* **52** (2000) 231.
- 44) A. M. Rodrigo, M. E. Martinez, M. L. Escudero, J. Ruiz, P. Martinez, L. Saldana, L. Gomez-Garcia, L. Fernandez, J. Cordero and L. Munuera, *Biomaterials* **22** (2001) 755.
- 45) R. Kumazawa, F. Watari, N. Takashi, Y. Tanimura, M. Uo and Y. Totsuka, *Biomaterials* **23** (2002) 3757.
- 46) M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche and G. Schmid, *Small* **1** (2005) 841.
- 47) T. J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink and W. J. Stark, *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006) 4374.
- 48) T. Kodama, *J. Stomatol. Soc. Jpn.* **38** (1989) 263.
- 49) J. P. Landsberg, B. McDonald and F. Watt, *Nature* **360** (1992) 65.
- 50) 神山宣彦, セラミックス **29** (1994) 111.
- 51) M. F. Stanton, M. Layard, A. Tegeris, E. Miller, M. May, E. Morgan and A. Smith, *J. Natl. Cancer Inst.* **67** (1981) 965.
- 52) F. Pott, *IARC Sci. Pub. No.30*, Vol.1, (1980) 286.
- 53) G. A. Hart, L. M. Kathman and T. W. Hesterberg, *Carcinogenesis* **15** (1994) 971.
- 54) A. Huczko, H. Lange, E. Calko, H. Grubek-Jaworska and P. Droszcz, *Fullerene Sci. Technol.* **9** (2001) 251.
- 55) A. Huczko, H. Lange, M. Bystrzejewski, P. Baranowski, H. Grubek-Jaworska, P. Nejman, T. Przybyłowski, K. Czumińska, J. Glapiński, D. R. M. Walton and H. W. Kroto, *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.* **13** (2005) 141.
- 56) D. B. Warheit, B. R. Laurence, K. L. Reed, D. H. Roach, G. A. M. Reynolds and T. R. Webb, *Toxicol. Sci.* **77** (2004) 117.
- 57) C. W. Lam, J. T. James, R. McCluskey and R. L. Hunter, *Toxicol. Sci.* **77** (2004) 126.
- 58) J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J. -F. Heilier, M. Delos, M. Arras, A. Fonseca, J. B. Nagy and D. Lison, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207** (2005) 221.
- 59) A. Huczko and H. Lange, *Fullerene Sci. Technol.* **9** (2001) 247.
- 60) A. A. Shvedova and V. Castranova, *J. Toxicol. Environ. Health A.* **66** (2003) 1909.
- 61) N. A. Monteiro-Riviere, R. J. Nemanich, A. O. Inman, Y. Y. Wang and J. E. Riviere, *Toxicol. Lett.* **155** (2004) 377.
- 62) I. Fenoglio, M. Tomatis, D. Lison, J. Muller, A. Fonseca, J. B. Nagy and B. Fubini, *Free Radic. Biol. Med.* **40** (2006) 1227.
- 63) M. Bottini, S. Bruckner, K. Nika, N. Bottini, S. Bellucci, A. Magrini, A. Bergamaschi and T. Mustelin, *Toxicol. Lett.* **160** (2006) 121.
- 64) S. Koyama, M. Endo, Y. -A. Kim, T. Hayashi, T. Yanagisawa, K. Osaka, H. Koyama, H. Haniu and N. Kuroiwa, *Carbon* **44** (2006) 1079.
- 65) J. Chłopek, B. Czajkowska, B. Szaraniec, E. Frackowiak, K. Szostak and F. Béguin, *Carbon* **44** (2006) 1106.
- 66) C. M. Sayes, F. Liang, J. L. Hudson, J. Mendez, W. Guo, J. M. Beach, V. C. Moore, C. D. Doyle, J. L. West, W. E. Billups, K. D. Ausman and V. L. Colvin, *Toxicol. Lett.* **161** (2006) 135.
- 67) R. Singh, D. Pantarotto, L. Lacerda, G. Pastorin, C. Klumpp, M. Prato, A. Bianco and K. Kostarelos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103** (2006) 3357.
- 68) H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J. -P. Briand, M. Prato, S. Muller and A. Bianco, *Nano Lett.* **6** (2006) 1522.
- 69) X. Chen, U. C. Tam, J. L. Czapinski, G. S. Lee, D. Rabuka, A. Zettl and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 6292.
- 70) Y. Sato, A. Yokoyama, K. -I. Shibata, Y. Akimoto, Y. Nodasaka, T. Kohgo, K. Tamura, T. Akasaka, M. Uo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, M. Ishiguro, R. Hatakeyama, F. Watari and K. Tohji, *Mol. BioSyst.* **1** (2005) 176.
- 71) J. Liu, A. G. Rinzler, H. Dai, J. H. Hafner, R. K. Bradley, P. J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C. B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y. S. Shon, T. R. Lee, D. T. Colbert and R. E. Smalley, *Science* **280** (1998) 1253.
- 72) Y. Sato, K. -I. Shibata, F. Bunshi, A. Yokoyama, K. Tamura, T. Akasaka, M. Uo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, R. Hatakeyama, F. Watari and K. Tohji, *Mol. BioSyst.* **1** (2005) 142.
- 73) M. Ishikuro, Y. Sato, K. Tohji and K. Wagatsuma, *Buniseki Kagaku* **55** (2006) 117.
- 74) M. Sano, J. Okamura and S. Shinkai, *Langmuir* **17** (2001) 7172.
- 75) N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji and F. Watari, *J. Biomed. Nanotechnol.* **1** (2005) 402.
- 76) N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji and F. Watari, *Chem. Lett.* **35** (2006) 508.
- 77) IARC, *IARC Sci. Pub. No.97* (1990).
- 78) J. M. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp and H. F. Krug, *Nano Lett.* **6** (2006) 1261.