

生体応用を指向したカーボンナノチューブ架橋高分子被覆法の開拓とそのサイズ制御

堤, 優介

<https://doi.org/10.15017/1654847>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済



九州大学大学院工学府

化学システム工学専攻

博士論文

生体応用を指向した
カーボンナノチューブ架橋高分子被覆法の開拓と
そのサイズ制御

平成28年2月

堤 優介

目次

1 章

緒言	1
1-1. はじめに	1
1-2. カーボンナノチューブ (CNT)	1
1-3. がん診断・治療薬としての CNT	2
1-3-1. 細胞による CNT の取り込み	2
1-3-2. CNT の大きな疎水表面	4
1-3-3. CNT の光学特性	5
1-3-4. CNT のがん集積性	8
1-4. CNT の表面修飾	9
1-4-1. 化学修飾	9
1-4-2. 物理修飾	10
1-4-3. 「架橋」を利用した表面修飾	13
1-5. 本論文の構成	14
参考文献	15

2 章

ミセル内部空間を重合場として利用した SWNT 架橋高分子被覆	19
2-1. 序	19
2-2. 実験	21
2-2-1. 使用試薬	21
2-2-2. 使用機器	21
2-2-3. 架橋 PNIPAM 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM) の合成と評価	22
2-2-4. 架橋 PNIPAM/PEG 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM-PEG) の合成と評価	22
2-2-5. 架橋 PNIPAM-PEG 層の被覆安定性評価	23
2-2-5-1. 凍結乾燥・再分散後の評価	23
2-2-5-2. SDS との置換による分散剤脱離誘起後の評価	23
2-3. 結果・考察	24
2-3-1. 架橋 PNIPAM 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM) の合成と評価	24
2-3-2. 架橋 PNIPAM/PEG 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM-PEG) の合成と評価	30
2-3-3. 架橋 PNIPAM-PEG 層の被覆安定性評価	35
2-3-3-1. 凍結乾燥・再分散後の評価	35
2-3-3-2. SDS との置換による分散剤脱離誘起後の評価	36

2-4. まとめ	39
参考文献.....	40
3 章	
架橋高分子被覆 SWNT 合成における必要条件の探索	42
3-1. 序	42
3-2 実験.....	43
3-2-1. 使用試薬	43
3-2-2. 使用機器	43
3-2-3. 様々な架橋高分子被覆 SWNT (7 種類) の合成.....	44
3-2-4. 合成における必要条件の探索 (モノマー添加後の吸収スペクトル測定)	44
3-2-5. 合成における必要条件の探索 (ミセル内での粒子形成の可否を観察)	45
3-3. 結果・考察	46
3-3-1. 様々な架橋高分子被覆 SWNT (7 種類) の合成.....	46
3-3-2. 合成における必要条件の探索 (モノマー添加後の吸収スペクトル測定)	53
3-3-3. 合成における必要条件の探索 (ミセル内での粒子形成の可否を観察)	55
3-4. まとめ	58
参考文献.....	59
4 章	
架橋高分子被覆 SWNT の短尺化.....	60
4-1. 序	60
4-2 実験.....	63
4-2-1. 使用試薬	63
4-2-2. 使用機器	63
4-2-3. 超遠心分離の「重力加速度」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響.....	63
4-2-4. 超遠心分離の「時間」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響	63
4-2-5. 超遠心分離の「回数」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響	64
4-2-6. 異なる架橋密度を有する SWNT/PNIPAM に対して超遠心分離による切断.....	65
4-2-7. SWNT/PNIPAM-PEG に対して超遠心分離による切断の適用.....	66
4-3. 結果・考察	67
4-3-1. 超遠心分離の「重力加速度」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響.....	67
4-3-2. 超遠心分離の「時間」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響	70
4-3-3. 超遠心分離の「回数」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響	72
4-3-4. 異なる架橋密度を有する SWNT/PNIPAM に対して超遠心分離による切断.....	76
4-3-5. SWNT/PNIPAM-PEG に対して超遠心分離による切断の適用.....	82

4-4. まとめ	83
参考文献.....	84

5 章

結言	86
謝辞	88

1 章

緒言

1-1. はじめに

ナノマテリアルとは、少なくとも一次元が 100 nm より小さい物質のことである。現在、様々なナノマテリアルが、電子材料、スポーツ用品、触媒、化粧品、バイオ材料など幅広い分野で利用されている。バイオ分野で見れば、「シリカナノ粒子」「金ナノ粒子」「量子ドット」「高分子ナノ粒子」「カーボンナノチューブ」「グラフェン」などが、その光学特性・磁気特性・多様な表面修飾能等を利用して、細胞小器官や生体分子の機能化、およびバイオイメージングやがん治療への応用へ向けて研究されている¹。特に、未だに死亡率の高い「がん」の診断・治療に対するナノマテリアルの使用は、副作用の軽減、死亡率の減少、生活の質の向上を同時に達成する可能性を秘めている。これは、ナノマテリアルが正常細胞を避け、がん細胞のみを標的とする能力を有するからである。そして、様々なナノマテリアルの中でも、「カーボンナノチューブ」は、一次元構造・大きな疎水表面・特異な光学特性といった他のナノマテリアルとは異なる性質を有しており、がん診断・治療薬としての利用が大いに期待されている。しかしながらこの材料を生体へと応用するには、その分散のための表面修飾が非常に重要な課題となっている。そこで本章では、まずカーボンナノチューブの基本特性を交えながらがん診断・治療薬としての利点について述べる。その後、従来の表面修飾法、本論文の構成について順を追って記している。

1-2. カーボンナノチューブ (CNT)

1991 年、飯島澄男により発見されたカーボンナノチューブ (Carbon nanotubes, CNT)²は、グラフェンシートを継ぎ目なく円筒状に巻き上げた構造をしている。CNT には、グラフェンシートが 1 層である単層カーボンナノチューブ (single-walled carbon nanotube, SWNT、**Figure 1-1 (a)**) と、複数の円筒が入れ子になった多層の多層カーボンナノチューブ (multi-walled carbon nanotube, MWNT、**Figure 1-1 (b)**) が存在する。CNT の構造上の特徴としては、外径はナノメートルオーダー、長さはマイクロメートルオーダーで、高いアスペクト比 (300-1000)、剛直な一次構造、芳香環のみからなる疎水的表面などが挙げられる。また、CNT は電気伝導性、熱伝導性、機械的強度、光学特性などで従来の物質にない優れた特性を有し、幅広い用途への応用可能性を持っている³ため 21 世紀を支える重要な素材になると期待されている。

現在のところ、CNT が毒性を与えずに細胞に取り込まれる性質⁴を利用した「薬剤^{5,6}・遺伝子⁷・タンパク質⁸のキャリア」、生体透過性の高い近赤外域に吸収・発光を持つことを

利用した「光熱治療剤⁹」「バイオセンサー¹⁰」「イメージング剤¹¹」、ナノファイバー上の構造と疎水表面を利用した「細胞足場¹²」など、非常に多岐にわたる応用が提案されている。

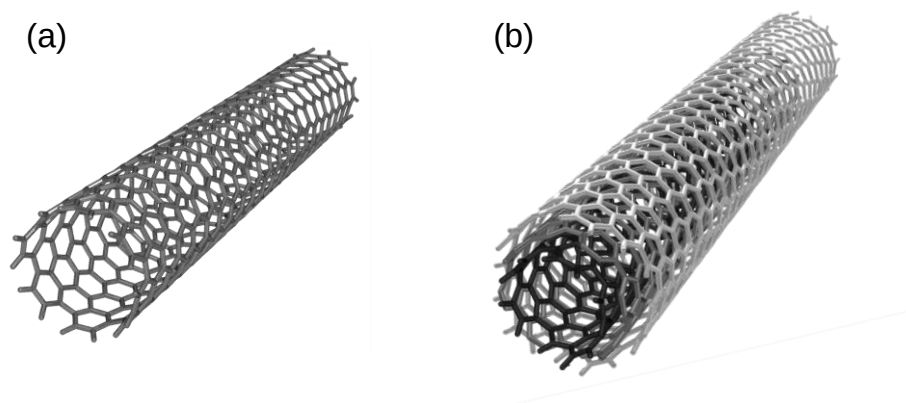


Figure 1-1. Schematic illustration of (a) SWNT and (b) MWNT.

1-3. がん診断・治療薬としての CNT

がん治療は進歩しているものの、がん死亡率は未だに高いのが現状である。また現在の治療法は、がんの種類によっては有効でないものや、副作用や侵襲性など患者に対して大きな負担を与えるものであり、QOL (quality of life) の低下につながっている。そのような中、ナノマテリアルは正常細胞を避けがん組織のみを標的化する（がん組織を選択的に破壊する）機能、また、イメージング剤と薬剤を一体化し、「診断」と「治療」が同時に行える、いくつかの治療を組み合わせられるなどの多機能性を付与できるため、その使用は生存率の向上、副作用の低減をもたらす事が期待されている¹³。

がん診断・治療薬として CNT を見たとき、他のナノマテリアルと比較して優れているのは、①一次元構造に起因した細胞による容易な取り込み、②大きな疎水表面、③光学特性、④高いがん集積性、を同時に備えていることが挙げられる。これらの特性と、その研究例について順に紹介していく。

1-3-1.細胞による CNT の取り込み

生物医学的な治療において、薬剤や細胞外種が細胞膜を通過することは非常に重要である。特にドラッグデリバリーシステム (DDS) においては、キャリアが選択した薬剤を保持し、生物学的機能に悪影響を与えずに細胞膜を通過して薬剤を運べるかどうかにかかっている。そんな中、CNT は高いアスペクト比を持つために細胞膜を貫通し、細胞によって容易に取り込まれることがわかっている¹⁴。細胞に取り込まれた後は、主にエンドソームやリソソームに存在し、孤立分散した CNT は細胞核にまで到達するものも存在する¹⁵。

一方で、細胞による CNT の取り込みメカニズムに関しては正確なことは未だわかっていないのが現状である。現在、CNT に対する細胞の取り込みメカニズムとして考えられてい

るのは、①エンドサイトーシスおよびファゴサイトーシスと②受動拡散である (Figure 1-2)。エンドサイトーシスとは、細胞がウイルスのような細胞外粒子 (～100 nm) をベシクルの形成を通して飲み込むことを意味し、ファゴサイトーシスは基本的にはエンドサイトーシスと似ているが、細菌 (～1 μm) のようなより大きな粒子を取り込むことを意味する。これらの経路は、エネルギー依存性を持ち低温、低 ATP 環境下では妨げられる¹⁶。一方、受動拡散はエネルギーに依存しないプロセスで起こり、CNT が針のように脂質二重膜を貫通し拡散する¹⁷。

CNT における正確な取り込みメカニズムを理解するために様々な研究が行われている。Kam らは、2 種類の細胞と共にタンパク質および DNA を表面

に吸着させた SWNT を培養し、SWNT によるタンパク質と DNA の輸送実験を行った。その際、受動拡散による物質の侵入を防ぐような化合物 (Filipin、Nystatin) を添加した場合にも SWNT の細胞内への取り込みが見られたため、主な取り込みメカニズムは、エネルギー依存的なエンドサイトーシスであると報告した¹⁸。また、Bianco らはストレプトアビジン/CNT 複合体の細胞取り込みを調べたところ、エンドソーム内で CNT が観察され、エンドサイトーシスによる取り込みを報告した⁸。さらに Porter らの報告では、正常細胞のファゴソームとリソソームの内部で SWNT がイメージングでき、ファゴサイトーシスによる SWNT の取り込みが示唆されている¹⁹。

一方で、受動拡散による CNT の取り込みを示している報告も存在する。Pantarotto らは、SWNT と細胞をエンドサイトーシスが起こりにくい 4 °C で共培養した場合にも、SWNT の取り込みは防がれなかったことから、SWNT の取り込みは受動拡散で起こると結論づけた⁴。また、Raffa らは、短い MWNT (<1 μm) はすぐさま細胞に取り込まれるが、長いものは取り込まれないと述べている²⁰。これは、短い MWNT は真っ直ぐな「ナノニードル」として振る舞い、より効率的に細胞膜を貫通することが出来るが、長い CNT はコイル状やバンドル状の形で配列し効率的な取り込みが阻害されるためであると思われる。

以上に述べたように、CNT の細胞取り込みメカニズムについては未だに議論がなされている。研究者によって用いている CNT の種類、修飾の仕方、分散状態に違いがあるため、

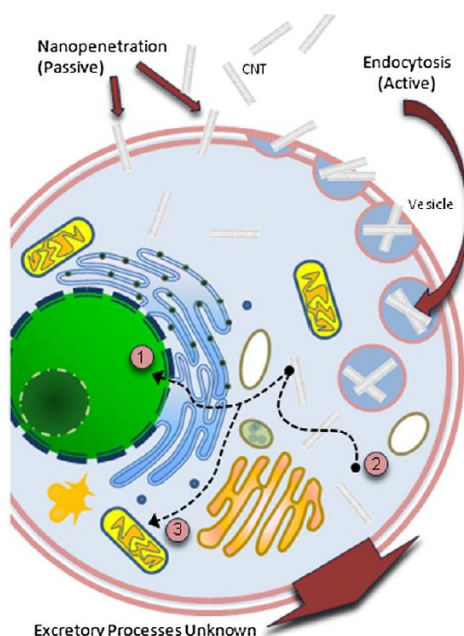


Figure 1-2. Schematic illustration of receptor-mediated endocytosis or nanopenetration, which are suggested as possible mechanisms for CNT interactions with cells. The figure is taken from ref. 16.

様々なメカニズムが提唱されていると思われる。

1-3-2. CNT の大きな疎水表面

CNT の比表面積は、直径 1.36 nm の SWNT で約 1900 m²/g と計算されており、内壁も吸着に寄与できるとすると合計約 2700 m²/g に及ぶと見積もられている^{21, 22} (MWNT は直径に大きく依存する)。この値はメソポーラスシリカ (約 1000 m²/g)^{23, 24} 等の多孔質材料をも上回る値である。この巨大な疎水表面は薬剤や核酸などの担時に利用できるため、CNT は薬剤^{5, 6}・遺伝子⁷・タンパク質⁸を送達するキャリアとしての応用が可能である。ここでは、薬剤送達キャリアとしての報告を紹介する。

これまでに、実際に CNT 表面への担時および細胞内への送達が報告されている抗がん剤としては、doxorubicin^{5, 6}、daunorubicin⁵、camptothecin²⁵、methotrexate²⁶、paclitaxel²⁷ (**Figure 1-3**) などがある。中でも Doxorubicin (DOX) は特によく知られる抗癌剤であり、一般的には塩を形成した状態で静脈注射される。過去にはリポソームでの送達 (DOXIL) によって副作用を減らすことに成功しているが、血流から速く排出される、細胞取り込み効率が低いといった問題があった²⁸。そこで Liu らは、PEG 化した SWNT の表面に DOX を担持させ、新たな薬剤の形である SWNT-DOX (**Figure 1-4**) を報告した⁶。この SWNT-DOX は、SWNT 1 g 当たりに最大 DOX 4 g という高い薬剤保持率 (SWNT 側面の 70 – 80% 使用) を示し、腫瘍を抑制しつつフリーの DOX や DOXIL よりも毒性が顕著に減少することがわかった。また、この複合体は中性では安定に存在し、酸性環境下で分離する⁵。よって、DOX の脱離をわずかに酸性な腫瘍部位でのみ起こすことが可能である。CNT 表面に薬剤を担持させる手法は操作が容易であり、さらに **Figure 1-3** に示すような様々な抗がん剤に対して適用可能であるため非常に魅力的である。

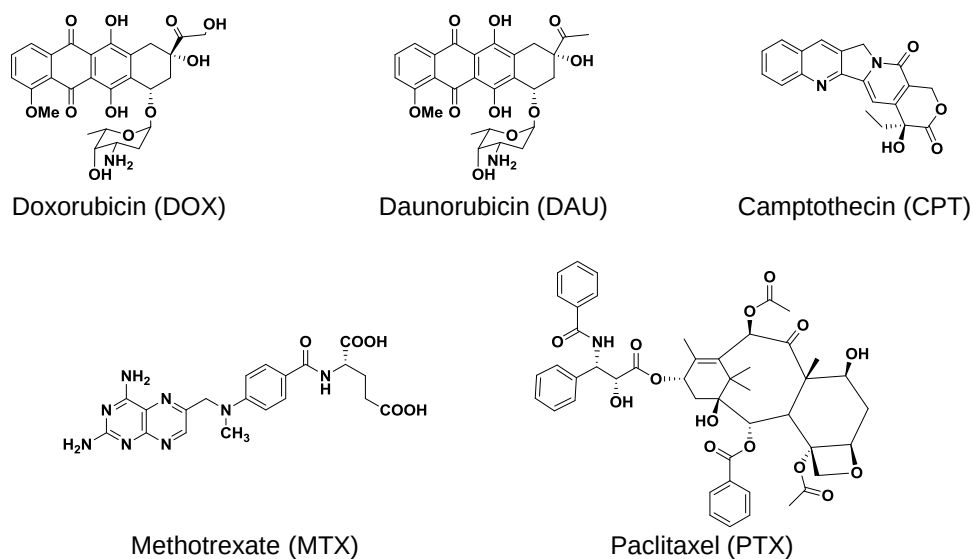


Figure 1-3. Chemical structures of the drug molecules capable of adsorbing on CNTs.

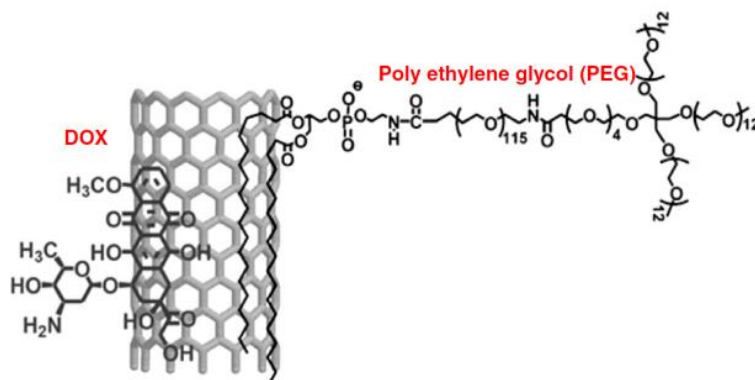


Figure 1-4. Schematic illustration of the SWNT-DOX reported by Dai et al. The figure is taken from ref. 6.

1-3-3. CNT の光学特性

バイオ分野では CNT の光学特性が非常に重要な役割を果たす。まず、CNT は前述のように SWNT と MWNT に分けられ、SWNT はさらに半導体性と金属性に分類される。**Figure 1-5** は半導体性 SWNT と金属性 SWNT の電子状態密度である。SWNT は形状の 1 次元性のためにバンド構造が量子化したファンホーブ特異点と呼ばれる状態密度が特異的に高いバンドを持ち、このバンド間遷移に伴う吸収・発光を持つ^{29, 30}。半導体性 SWNT の場合、光吸収により励起された電子は輻射/無輻射過程を経て緩和される。輻射過程では発光（蛍光・燐光）がおき、無輻射過程では一般的に熱放出がおきる。両者は互いに競合し、半導体性 SWNT の場合では Smalley らの報告によれば数%が輻射過程にあたる³¹。一方、金属性 SWNT と MWNT では吸収された光は全て熱として放出される。

特に、CNT による光吸収と、それに伴う発光（半導体性 SWNT のみ）・発熱は生体透過性の高い近赤外域（ほとんどの生体組織は近赤外域に吸収を持たない）³²⁻³⁶ においても観察される点が非常に重要である。この特異的な光学特性を利用して、CNT のバイオイメージングや光熱治療への応用が可能である（**Figure 1-6**）。また、SWNT の質量消散係数は 808 nm において 46.5 L/(g·m)³⁷ であり、金ナノロッド(13.89 L/(g·m))³⁷ や酸化グラフェン(24.6 L/(g·m))³⁸ よりも大きい点も魅力的である。

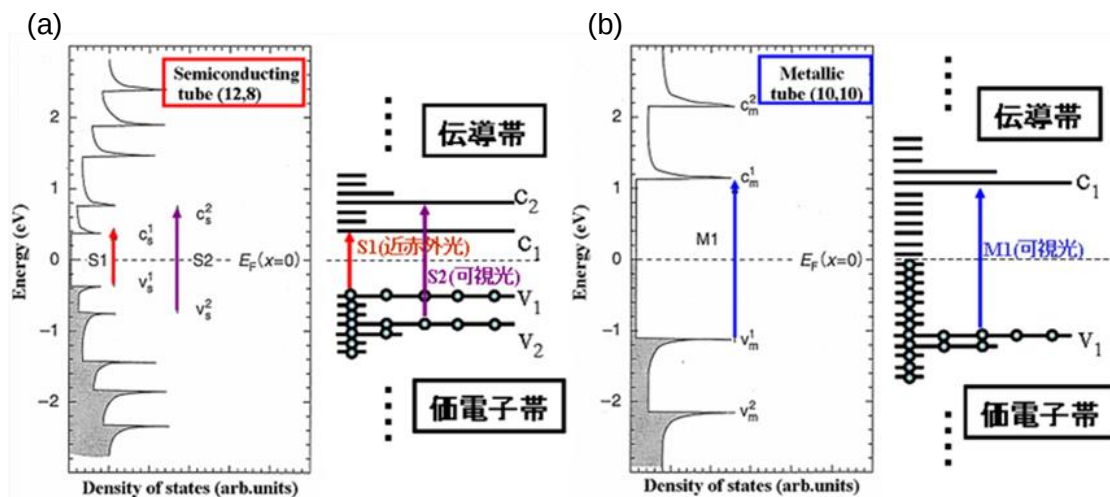
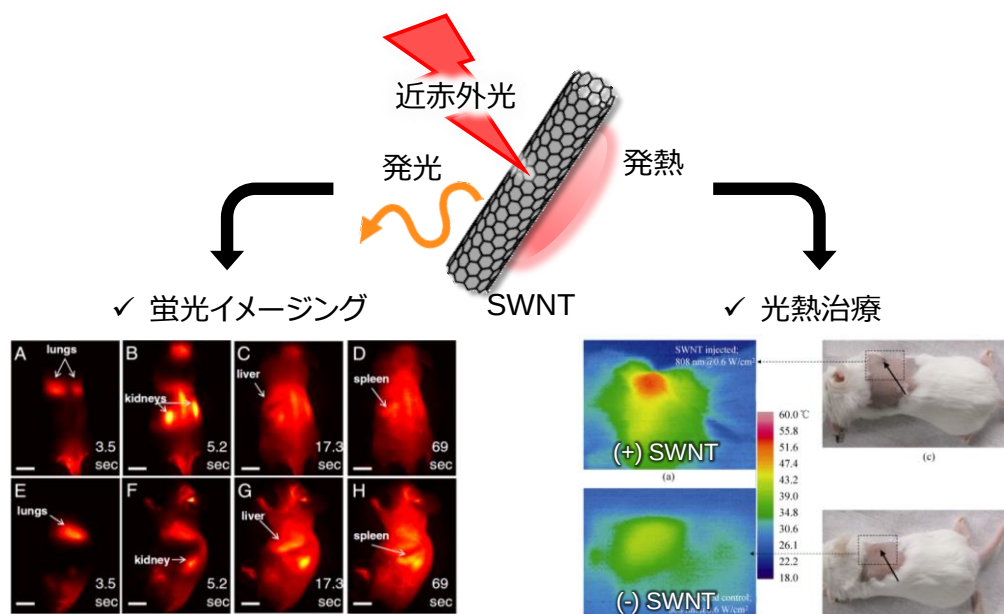


Figure 1-5. Schematic illustration of electronic structures of (a) metallic SWNTs and (b) semiconducting SWNTs.



Taken from K. Welscher et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 8943.

Taken from J. T. Robinson et al., *Nano Res.* **2010**, 3, 779.

Figure 1-6. Schematic illustration showing the optical properties of SWNTs. These data are taken from ref. 37 and 42.

バイオイメージングとは、生物の分子や細胞レベルでの生体内作用を可視化、特性評価、測定すること³⁹を指す。ここでは、特に半導体性 SWNT の発光を利用した光学イメージングを中心に述べる。光学イメージングを行う上で大きな障害となるのは、生体組織における光透過率の低さと光の散乱である。そこで、生体透過率が高く、組織や血液に自家蛍光がほとんどない近赤外光の利用が重要となってくる。上述したように、SWNT は近赤外域に吸収・発光を持つため、この利用が可能であり、さらに SWNT は他の蛍光色素で問題となる光退色がないことから長期間のイメージングが期待できる。そのため、様々な報告がなされている。Welsher らは、抗体と PL-PEG を結合させた後 SWNT と複合体を形成し、抗体に特異的なレセプターを持つ細胞 (BT474) だけを選択的に光らせることに成功した⁴⁰。また、Weisman らはキイロショウジョウバエの幼虫の餌に SWNT を混ぜ、生きた幼虫内の SWNT を近赤外光顕微鏡でモニターし、生体内分布を見積もっている⁴¹。さらに近年では、従来の NIR-I 領域 (700-900 nm) よりも長波長側の NIR-II 領域 (1100-1400 nm) での発光検出を利用したイメージングが報告されるようになった^{42,43}。NIR-II 領域は水の吸収が若干あるものの、生体組織の吸収・散乱が NIR-I 領域よりもさらに小さく、自家蛍光を大幅に減少させることが可能である。この他にも、ラマン散乱を利用したイメージング、パルス光照射で発生する音響波を検出する光音響イメージング⁴⁴などに CNT は利用されている。特に、光音響イメージングは発光ではなく音波を検出するため、検出感度が良い。さらに、SWNT 表面に増感剤として色素を担持させることで、SWNT 単体の場合の検出限界である 50 nM から 170 pM へと検出限界の大幅な向上に成功している報告も存在する⁴⁵。

次に、CNT の発熱を利用した癌の光熱治療について紹介する。この治療法は、正常組織にダメージを与えずに、処方する組織部位に致死量の熱を与えることを目的とする。同濃度では SWNT の方が金ナノロッドよりも 10 倍少ない投与量、3 倍低いエネルギーでがんを破壊できることが報告されており³⁷、CNT での効果的な治療が期待できる。Choi らは、固形悪性腫瘍内部に PEG 化した SWNT を投与し近赤外光を照射した場合の効果を *in vivo* で研究した⁹。その結果、有害な副作用もなく腫瘍の完全な破壊が見られ、6 ヶ月後も腫瘍の再発はなかった。一方でコントロールとして SWNT を投与しなかった場合や近赤外光を照射しなかった場合は、腫瘍は成長し続ける事がわかった。更に、投与された SWNT の多くは約 2 ヶ月でマウスから完全に除去された。DNA で被覆した MWNT⁴⁶やリン脂質-PEG⁴⁷で分散した SWNT を用いて行われた研究もこの結果を支持するものであった。近年では、NIR-II 領域をイメージングしながら、原発がんと転移がんの両方を治療することで大幅な延命効果が得られたとする報告もなされている⁴⁸。

1-3-4. CNT のがん集積性

続いて CNT のがん集積性について述べる。がん組織へのターゲティングを実現する方法には、アクティブターゲティングとパッシブターゲティングの 2 種類がある⁴⁹。アクティブターゲティングは、がん細胞に特異的に発現しているレセプターに対するリガンドをキャリアに修飾して行うターゲティングである。がん細胞と正常細胞が混在した状況で、キャリアががん細胞にのみ選択的に結合し、がん細胞のみに殺細胞活性を示す。一方、パッシブターゲティングでは標的との特異的な相互作用は利用しない。このパッシブターゲティングを可能にするのが Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果である。EPR 効果とは、がん組織では血管内皮の透過性は異常に亢進していると同時に、リンパ系による排出が抑制されているために、ナノ粒子 (10~200 nm 位) が本質的に固形がん部位に選択的に蓄積しやすい性質のことである。ここで重要なのは、EPR 効果で得られるがん組織／正常組織の選択性の比が、数倍~数十倍になるということ、そして血管を透過するこのパッシブな過程が、ターゲティングの第一段階であるということである。つまり、いくらアクティブターゲティングのための修飾を行っても、パッシブな側面を制御しなければ、効果的なターゲティングは出来ない。よって、ナノ粒子のサイズも非常に重要な要素である。

CNT は他のナノマテリアルに比べてがん集積性が高いことが知られている。2007 年に Liu らが行った研究では、長さ 100~300 nm の SWNT に RGD (リガンド) と PEG を修飾した複合体のがん取り込み効率が ~13 % injected dose (ID)/g) であると報告されている⁵⁰。この値は、今まで報告されているナノ粒子の中で最も高い。これは、SWNT の柔軟な一次元構造が多価効果 (SWNT 上の多数の RGD が多数のインテグリンと相互作用する) を可能にし、腫瘍への結合力を高めることが原因の一つと考えられる。実際に、RGD ペプチドのみよりも複合体にすることで結合力が高まることが実験で示されている⁵⁰。リガンドに RGD を用いた他のナノマテリアルに限って比較してみると、量子ドット⁵¹、酸化鉄ナノ粒子⁵²、ミセル⁵³、金ナノロッド⁵⁴でそれぞれ、~4、~6、~6、~6 % ID/g) であり、SWNT がいかにがん組織に蓄積しやすいかがわかる。また、SWNT と量子ドットをマウスのがん組織に投与し、形状の違いががん血管からの漏出に与える影響を調査したところ、がんの種類により SWNT と量子ドットの漏出率 (集積率) が異なるという報告例⁵⁵があるため、球状ナノ粒子では治療困難ながんの治療が、CNT により可能となるかもしれない。

1-4. CNT の表面修飾

1-3 節で述べたような優位性があるにもかかわらず、CNT のバイオナノマテリアルとしての利用は未だ研究段階である。その実用化を妨げている最も大きな障壁は、CNT の「低い溶解性」である。CNT は疎水性が強く、さらにチューブ間で強力な $\pi - \pi$ 相互作用が働くためバンドル化し溶媒和が阻害され、水にも有機溶媒にも難溶である。バンドル化した凝集状態ではバイオナノマテリアルとして利用できないだけでなく、毒性が高まることも報告されている⁵⁶。そのため、安定に分散した CNT を得ることが必要不可欠である。本節では、CNT の分散のために従来行われてきた表面修飾法、そして最近報告されている「架橋」を利用した表面修飾法について述べる。

1-4-1. 化学修飾

修飾法には、大きく分けて化学修飾と物理修飾がある。化学修飾は、溶媒和を可能にする官能基を共有結合的に CNT 表面に導入するアプローチ (**Figure 1-7**) のことである。これまでに多種多様な化学修飾法が報告されており、強酸処理・プラズマ酸化処理のような表面処理を通して CNT 表面に $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-C=O$ のような官能基を導入し、極性溶媒中での静電的安定性を高める報告^{57, 58}や、フッ素・チオール基を導入し有機溶媒中での溶解性を向上させている報告^{59, 60}がある。生体内で CNT を用いることを考えた場合には、修飾分子は生体適合性を有する必要がある。Schipper らは、SWNT を酸化した後、さらに poly(ethyleneglycol) (PEG) のような親水性の高分子を結合させることで生体環境においても安定な CNT-polymer 複合体を得ている⁶¹。さらに、幅広く利用されている化学修飾法は付加環化であり、この反応は CNT の末端や欠陥部分ではなく側壁で起こる。付加環化はアジド⁶²やカルベン⁶³と CNT との光化学反応によって行われる。また、現在一般的に使用される反応は、Prato らによって開発された CNT の 1,3-双極性環状付加反応である⁶⁴。この反応では、 α -アミノ酸とアルデヒドの脱水縮合によって生成されるアゾメチンイリドが加えられることで、CNT 側壁にピロリジンが形成される。この修飾した α -アミノ酸に PEG のような官能基を導入し、更にこの PEG はペプチドや薬剤を修飾するのに使われる⁴。

このように化学修飾では、CNT 表面に直接官能基を結合させて CNT を分散させており、分散安定性は次に述べる物理修飾に比べると高い。しかしながら、否応なく CNT の表面構造を破壊してしまい、CNT が本来持つ特性（光学特性や疎水表面など）を失う可能性がある。

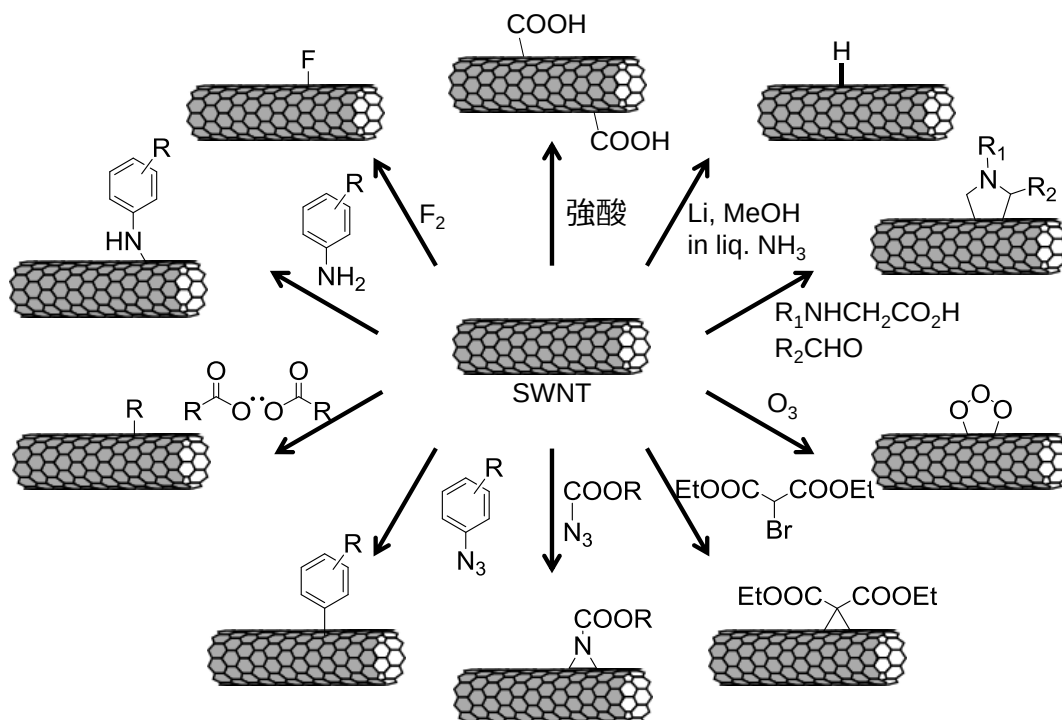


Figure 1-7. Schematic illustration describing various chemical functionalization of SWNTs.

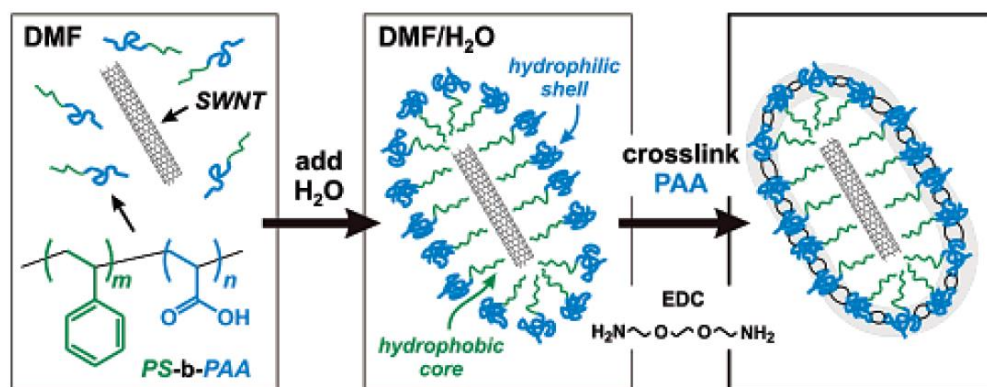
1-4-2. 物理修飾

物理修飾は、修飾分子が CNT 表面に物理吸着することで CNT を均一に分散させる方法 (Figure 1-8) であり、CNT の特性を維持したまま可溶化させることができる。この方法により、CNT の応用の幅は大きく広がった。物理吸着を利用した代表的な修飾分子として、界面活性剤分子^{65,66}、多環芳香族化合物⁶⁷⁻⁶⁹が挙げられる。さらには、ペプチド⁷⁰、プロテイン⁷¹などの生体分子も、疎水性領域と CNT 表面との間の疎水性相互作用によって CNT を分散出来ると報告されている。

1-4-3. 「架橋」を利用した表面修飾

ここでは、上記に述べたような「CNT 表面構造に影響を及ぼさない」かつ「非常に高い分散安定性を付与できる」の両方を満たす表面修飾法として、「架橋」を利用した手法を紹介する。CNT は分散剤として両親媒ポリマーや界面活性剤の使用により、ミセル形成による分散が可能である。CNT を分散後、このミセルを「架橋」して固定化することで分散剤の脱離を防ぎ、高い分散安定性を付与することが達成されている。

2003 年、架橋に基づく CNT 複合体作製において、先駆的な研究が報告された。Taton らは、架橋した両親媒性コポリマーで SWNT を内包する物理修飾法を報告した⁷⁸。彼らは両親媒性のポリスチレン-*b*-ポリアクリル酸 (PS-*b*-PAA) 共重合体を DMF 中で溶解させ、SWNT を添加後に超音波照射によって SWNT を分散させた。続いて水を加えていくことでミセル化が誘起され、そこに水溶性のジアミン架橋剤を添加し PAA 部分を架橋させている (Scheme 1-1)。こうして作製した複合体は様々な極性・無極性溶媒中で安定である。



Scheme 1-1. Strategy for encapsulating SWNTs within amphiphilic block copolymer shells, taken from ref. 78.

2007 年には Wang らが、重合可能部位を有する両親媒性ポリマー：PEG-ポリアクリル酸-ポリスチレン (PEG-PAA-PS) を使用して SWNT を分散後、縮合反応によりアミド結合を介してポリマーを架橋することで複合体 (SWNT PEG-egg) を合成した⁷⁹。この SWNT PEG-egg は SWNT の光学特性を維持しており、かつタンパク質添加後も置換は起こらないことが報告されている。その後、同様に縮合反応により界面活性剤を架橋させた報告もなされた⁸⁰。また、Kim らのグループは、重合可能なカウンターアニオンを持つカチオン性界面活性剤を使用して SWNT を可溶化し、その後カウンターアニオンのラジカル重合を行うことで架橋ミセルに内包された SWNT を合成する方法を発表した^{81, 82}。この方法で作製した複合体は、凍結乾燥後でも 10 分間の攪拌によって、簡単に再分散出来る。さらに、Thauvin らのグループは、SWNT 表面上でリング状に自己集合した脂質を重合させて複合体を作製している⁸³⁻⁸⁵。具体的には、光重合可能なジアセチレン部位とニトリロ酢酸から成る極性基を有する脂質を用いて SWNT を可溶化させた後、UV 光を照射することで複合体を得ている。

UV 照射後には、透析やメタノールで洗浄した時にも耐久性を持つようになったことから、脂質は重合されていると考えられた⁸³。また、カチオン性・非イオン性・アニオン性の光重合可能な両親媒性脂質を使用すると、それぞれ特有の pH に依存した分散特性を付与することが出来る。これらの複合体は沈殿・再分散の繰り返しの耐えることが出来るほど強固である⁸⁵。

以上のように、「架橋」によりミセルを CNT 表面に固定化することで修飾分子の脱離を防ぎ、高い分散安定性を付与することが達成されている。さらに、この手法では CNT 表面構造は維持されることも明らかとなっている。しかしながら、欠点も存在する。まず、CNT 表面のミセルを重合する場合、一本一本孤立分散した CNT 複合体を高収率で得ることは非常に難しい。これは、同一ミセル内での重合に対して、近接したミセル間での架橋形成に起因した CNT 複合体の凝集が起こること、さらにミセルから解離したモノマー同士の重合反応により CNT 表面の分散剤が不足し CNT の凝集が起こってしまうためである。そこで、重合部位を内部に持つ両親媒性分子の利用や、カウンターイオンを重合部位として用いることでこれらの問題の解決が試みられているが、すると今度は修飾分子に適切な分子設計が必要であり、複雑な合成スキームを必要とする、利用できる分子は限られるという問題が生じる。

1-5. 本論文の構成

これまでに述べたように、CNT はナノバイオマテリアル、特にがん診断・治療薬として非常に有望な材料であり、その細胞取り込み、がん診断・治療効果、毒性を考えた場合には、CNT 表面構造に影響を及ぼさず、かつ非常に高い分散安定性を付与できる表面修飾が強く求められている。そのための CNT の表面修飾法として、1-4-3 節で紹介した「架橋」を利用した表面修飾は非常に有効であるものの、孤立分散した CNT 複合体の収率は低い、修飾分子に複雑な合成スキームを必要とする、利用できる分子が限られる、といった問題が存在する。

そこで本論文では、2 章で「ミセル内部空間」を重合場とした「架橋高分子」の合成による新たな CNT 表面修飾法を開拓し、作製した架橋高分子被覆 CNT について詳細に評価を行ったので報告する。3 章では、2 章で示した表面修飾法を一般化するため、どのような合成条件時に複合体の合成が可能であるか、合成のための必要条件を調査した。4 章では、2 章で得られた架橋高分子被覆 CNT に対して超遠心分離を行うと、その切断が起こり、生体応用に最適なサイズ（長さ）へと制御出来ることを見出したので報告する。

参考文献

1. V. Biju, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 744.
2. S. Iijima, *Nature* **1991**, 354, 56.
3. R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. De Heer, *Science* **2002**, 297, 787.
4. D. Pantarotto, J. P. Briand, M. Prato, A. Bianco, *Chem. Commun.* **2004**, 10.1039/b311254c, 16.
5. Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, *ACS Nano* **2007**, 1, 50.
6. Z. Liu, A. C. Fan, K. Rakhra, S. Sherlock, A. Goodwin, X. Chen, Q. Yang, D. W. Felsher, H. Dai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7668.
7. C. Richard, N. Mignet, C. Largeau, V. Escriou, M. Bessodes, D. Scherman, *Nano Res.* **2009**, 2, 638.
8. N. W. S. Kam, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6021.
9. H. K. Moon, S. H. Lee, H. C. Choi, *ACS Nano* **2009**, 3, 3707.
10. D. A. Heller, E. S. Jeng, T.-K. Yeung, B. M. Martinez, A. E. Moll, J. B. Gastala, M. S. Strano, *Science* **2006**, 311, 508.
11. H. Gong, R. Peng, Z. Liu, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, 65, 1951.
12. S. L. Edwards, J. S. Church, J. A. Werkmeister, J. A. M. Ramshaw, *Biomaterials* **2009**, 30, 1725.
13. G. Seeta Rama Raju, L. Benton, E. Pavitra, J. S. Yu, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 13248.
14. S. Peretz, O. Regev, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, 17, 360.
15. Q. Mu, W. Liu, Y. Xing, H. Zhou, Z. Li, Y. Zhang, L. Ji, F. Wang, Z. Si, B. Zhang, B. Yan, *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 3300.
16. C. P. Firme, 3rd, P. R. Bandaru, *Nanomedicine* **2010**, 6, 245.
17. A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, *Curr Opin Chem Biol* **2005**, 9, 674.
18. N. W. Kam, Z. Liu, H. Dai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 577.
19. A. E. Porter, M. Gass, K. Muller, J. N. Skepper, P. A. Midgley, M. Welland, *Nat Nanotechnol* **2007**, 2, 713.
20. V. Raffa, G. Ciofani, S. Nitodas, T. Karachalios, D. D'Alessandro, M. Masini, A. Cuschieri, *Carbon* **2008**, 46, 1600.
21. A. Peigney, C. Laurent, E. Flahaut, R. R. Bacsa, A. Rousset, *Carbon* **2001**, 39, 507.
22. K. A. Williams, P. C. Eklund, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 320, 352.
23. D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6024.
24. D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **1998**, 279, 548.
25. N. G. Sahoo, H. Bao, Y. Pan, M. Pal, M. Kakran, H. K. F. Cheng, L. Li, L. P. Tan, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5235.
26. C. D. Modi, S. J. Patel, A. B. Desai, R. S. R. Murthy, *J. Appl. Pharm. Sci.* **2011**, 1, 103.

27. M. Das, R. P. Singh, S. R. Datir, S. Jain, *Bioconjugate Chem.* **2013**, 24, 626.
28. A. Fernandez-Fernandez, R. Manchanda, A. J. McGoron, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, 165, 1628.
29. 高分子学会 編, カーボンナノチューブ・グラフェン, 共立出版 **2012**.
30. 斉藤理一郎 著, フラーレン・ナノチューブ・グラフェンの科学 ナノカーボンの世界, 共立出版 **2015**.
31. M. J. O'Connell, S. H. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman, R. E. Smalley, *Science* **2002**, 297, 593.
32. Z. Liu, S. Tabakman, K. Welsher, H. Dai, *Nano Res.* **2009**, 2, 85.
33. A. M. Smith, M. C. Mancini, S. Nie, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 710.
34. K. Welsher, Z. Liu, S. P. Sherlock, J. T. Robinson, Z. Chen, D. Daranciang, H. Dai, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 773.
35. K. Welsher, S. P. Sherlock, H. J. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108, 8943.
36. A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, V. V. Tuchin, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2005**, 38, 2543.
37. J. T. Robinson, K. Welsher, S. M. Tabakman, S. P. Sherlock, H. Wang, R. Luong, H. Dai, *Nano Res.* **2010**, 3, 779.
38. J. T. Robinson, S. M. Tabakman, Y. Liang, H. Wang, H. Sanchez Casalongue, D. Vinh, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 6825.
39. D. A. Mankoff, *J. Nucl. Med.* **2007**, 48.
40. K. Welsher, Z. Liu, D. Daranciang, H. Dai, *Nano Lett.* **2008**, 8, 586.
41. T. K. Leeuw, R. M. Reith, R. A. Simonette, M. E. Harden, P. Cherukuri, D. A. Tsyboulski, K. M. Beckingham, R. B. Weisman, *Nano Lett.* **2007**, 7, 2650.
42. K. Welsher, S. P. Sherlock, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 8943.
43. G. Hong, J. C. Lee, J. T. Robinson, U. Raaz, L. Xie, N. F. Huang, J. P. Cooke, H. Dai, *Nat. Med.* **2012**, 18, 1841.
44. A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T.-J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B. T. Khuri-Yakub, S. S. Gambhir, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 557.
45. A. d. l. Zerda, Z. Liu, S. Bodapati, R. Teed, S. Vaithilingam, B. T. Khuri-Yakub, X. Chen, H. Dai, S. S. Gambhir, *Nano Lett.* **2010**, 10, 2168.
46. S. Ghosh, S. Dutta, E. Gomes, D. Carroll, R. D'Agostino, J. Olson, M. Guthold, W. H. Gmeiner, *ACS Nano* **2009**, 3, 2667.
47. N. W. Kam, M. O'Connell, J. A. Wisdom, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 11600.

48. C. Liang, S. Diao, C. Wang, H. Gong, T. Liu, G. Hong, X. Shi, H. Dai, Z. Liu, *Adv. Mater.* **2014**, 26, 5646.
49. 高分子学会 編, ドラッグデリバリーシステム, 共立出版 **2012**.
50. Z. Liu, W. Cai, L. He, N. Nakayama, K. Chen, X. Sun, X. Chen, H. Dai, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 47.
51. F. Chen, W. Cai, *Small* **2014**, 10, 1887.
52. X. Yang, H. Hong, J. J. Grailer, I. J. Rowland, A. Javadi, S. A. Hurley, Y. Xiao, Y. Yang, Y. Zhang, R. J. Nickles, W. Cai, D. A. Steeber, S. Gong, *Biomaterials* **2011**, 32, 4151.
53. Y. Xiao, H. Hong, A. Javadi, J. W. Engle, W. Xu, Y. Yang, Y. Zhang, T. E. Barnhart, W. Cai, S. Gong, *Biomaterials* **2012**, 33, 3071.
54. Y. Xiao, H. Hong, V. Z. Matson, A. Javadi, W. Xu, Y. Yang, Y. Zhang, J. W. Engle, R. J. Nickles, W. Cai, D. A. Steeber, S. Gong, *Theranostics* **2012**, 2, 757.
55. B. R. Smith, P. Kempen, D. Bouley, A. Xu, Z. Liu, N. Melosh, H. Dai, R. Sinclair, S. S. Gambhir, *Nano Lett.* **2012**, 12, 3369.
56. G. M. Mutlu, G. R. Budinger, A. A. Green, D. Urich, S. Soberanes, S. E. Chiarella, G. F. Alheid, D. R. McCrimmon, I. Szleifer, M. C. Hersam, *Nano Lett.* **2010**, 10, 1664.
57. B. Zhao, H. Hu, A. Yu, D. Perea, R. C. Haddon, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8197.
58. S. Banerjee, T. Hemraj-Benny, S. S. Wong, *Adv. Mater.* **2005**, 17, 17.
59. H. Muramatsu, Y. A. Kim, T. Hayashi, M. Endo, A. Yonemoto, H. Arikai, F. Okino, H. Touhara, *Chem. Commun.* **2005**, 10.1039/b416393a, 2002.
60. R. Zanella, E. V. Basiuk, P. Santiago, V. A. Basiuk, E. Mireles, I. Puente-Lee, J. M. Saniger, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 16290.
61. M. L. Schipper, N. Nakayama-Ratchford, C. R. Davis, N. W. Kam, P. Chu, Z. Liu, X. Sun, H. Dai, S. S. Gambhir, *Nat Nanotechnol* **2008**, 3, 216.
62. M. J. Moghaddam, S. Taylor, M. Gao, S. Huang, L. Dai, M. J. McCall, *Nano Lett.* **2004**, 4, 89.
63. K. S. Coleman, S. R. Bailey, S. Fogden, M. L. H. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8722.
64. N. Tagmatarchis, M. Prato, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 437.
65. T. Fujigaya, N. Nakashima, *Polym. J.* **2008**, 40, 577.
66. N. Nakashima, T. Fujigaya, *Chem. Lett.* **2007**, 36, 692.
67. N. Nakashima, Y. Tomonari, H. Murakami, *Chem. Lett.* **2002**, 31, 638.
68. H. Murakami, T. Nomura, N. Nakashima, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, 378, 481.
69. M. Shigeta, M. Komatsu, N. Nakashima, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 418, 115.
70. G. R. Dieckmann, A. B. Dalton, P. A. Johnson, J. Razal, J. Chen, G. M. Giordano, E. Muñoz, I. H. Musselman, R. H. Baughman, R. K. Draper, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1770.
71. B. F. Erlanger, B.-X. Chen, M. Zhu, L. Brus, *Nano Lett.* **2001**, 1, 465.
72. R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3838.

73. N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai, K. Yoshikawa, *Chem. Lett.* **2003**, 32, 456.
74. Y. Noguchi, T. Fujigaya, Y. Niidome, N. Nakashima, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 5966.
75. Z. Liu, C. Davis, W. Cai, L. He, X. Chen, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 1410.
76. P. Cherukuri, C. J. Gannon, T. K. Leeuw, H. K. Schmidt, R. E. Smalley, S. A. Curley, R. B. Weisman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 18882.
77. D. Roxbury, X. Tu, M. Zheng, A. Jagota, *Langmuir* **2011**, 27, 8282.
78. Y. Kang, T. A. Taton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5650.
79. R. Wang, P. Cherukuri, J. G. Duque, T. K. Leeuw, M. K. Lackey, C. H. Moran, V. C. Moore, J. L. Conyers, R. E. Smalley, H. K. Schmidt, R. B. Weisman, P. S. Engel, *Carbon* **2007**, 45, 2388.
80. K. E. Leach, H. N. Pedrosa, L. J. Carlson, T. D. Krauss, *Chem. Mater.* **2009**, 21, 436.
81. T. H. Kim, C. Doe, S. R. Kline, S. M. Choi, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 929.
82. C. Doe, S.-M. Choi, S. R. Kline, H.-S. Jang, T.-H. Kim, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, 18, 2685.
83. C. Thauvin, S. Rickling, P. Schultz, H. Celia, S. Meunier, C. Mioskowski, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 743.
84. E. Contal, A. Morère, C. Thauvin, A. Perino, S. Meunier, C. Mioskowski, A. Wagner, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 5718.
85. C. d. Thauvin, A. l. Perino, E. Contal, E. Morin, P. Schultz, S. p. Meunier, A. Wagner, *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 7319.

2 章

ミセル内部空間を重合場として利用した SWNT 架橋高分子被覆

2-1. 序

CNT の基礎研究、応用には CNT の分散が必須であり、分散を達成するためにその表面修飾が非常に重要である。とりわけ生体応用を考えた場合、CNT の凝集体は生体内で毒性を示すことが報告されている¹ため、安定な分散を可能にする表面修飾が強く求められる。また、CNT の光学特性、疎水的表面といった特性を利用するためには、修飾の際に CNT の表面構造の破壊は極力避けなければならない。

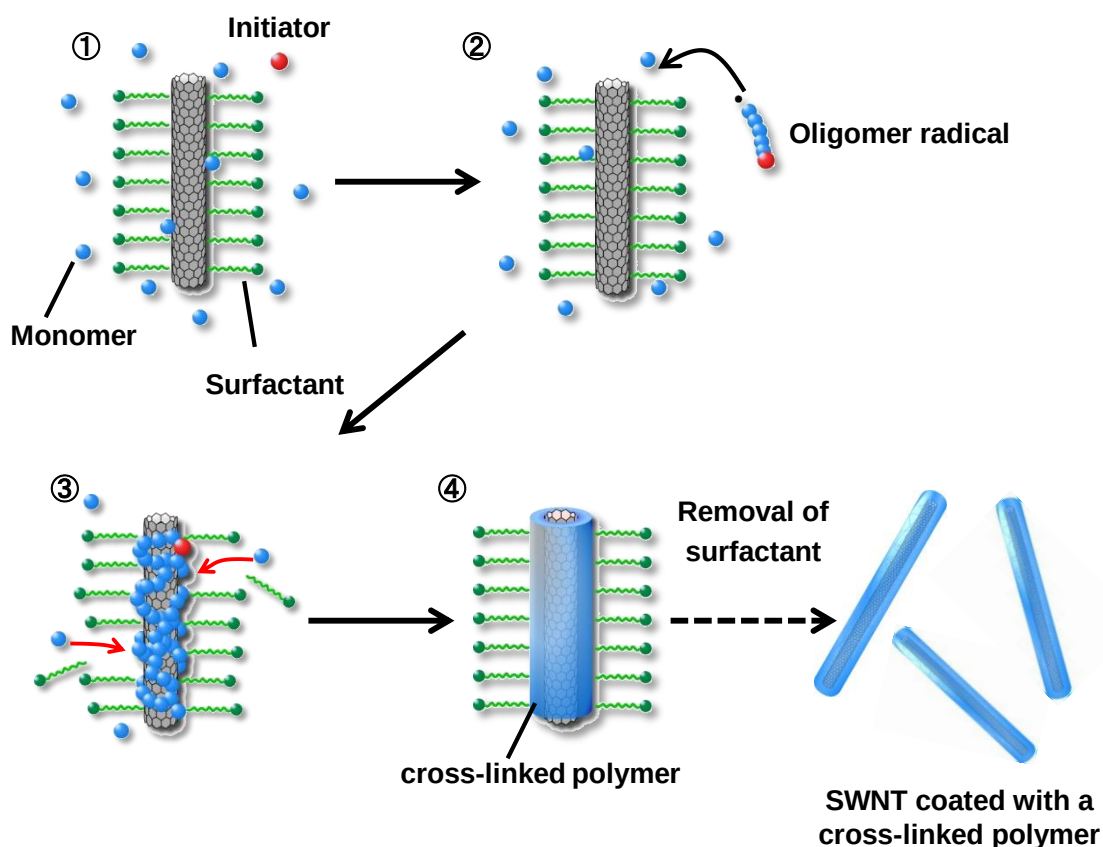
CNT の表面構造を維持し、かつ高い被覆安定性を付与できる修飾法として、「架橋」を利用した手法がいくつか報告されている²⁻⁹。これらの報告では、CNT をポリマーや界面活性剤などのミセルで分散後、このミセルを架橋して固定化することで脱離を防ぎ、高い安定性を付与している。しかしながらこれらの報告では、孤立分散した CNT 複合体の収率が低く、かつ修飾分子は適切な分子設計が必要なため複雑な合成スキームを必要とし、汎用性には欠ける。

一方、我々は SWNT と界面活性剤ミセルとの間の「内部空間」に注目した。近年、この空間への有機溶媒の侵入によるミセル核の膨張^{10,11}や、疎水性分子の侵入による複合体の作製^{12,13}、さらにこの空間を重合場として利用した CNT 複合体の合成^{14,15}などが報告され、「場」としての理解が進んでいる。そこで本研究では、このナノ空間を「重合場」として利用した「架橋高分子」の合成を試みた¹⁶。過去に、SWNT と高分子ゲルとを組み合わせた SWNT/高分子ゲル薄膜において、高分子ゲルの網目構造により SWNT の孤立分散の維持が達成されている^{17,18}。これらの結果から、架橋高分子で被覆された SWNT においても、SWNT を包み込むように形成された網目構造により、高い被覆安定性を付与出来ると思われる。また、本手法では SWNT 表面に積極的に化学結合は導入しないため、SWNT 表面構造の維持が期待できる。さらに、本修飾法では SWNT の分散は界面活性剤により達成されているため、用いる分子は SWNT を分散する能力を必要としない。よって、幅広い分子が利用可能であると考えられる。

ミセル内で合成する架橋高分子としては Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) を選択した。PNIPAM は代表的な温度応答性高分子として知られており、32 °C 近傍に下限臨界溶液温度 (LCST) を有し^{19,20}、LCST 以下ではアミド結合部位と水との強い相互作用により水和するが、LCST 以上では脱水和し相転移する。この性質を利用し、乳化重合による PNIPAM ナノ粒子の合成が数多く報告されている^{21,22}。乳化重合^{23,24}とは、ラジカル重合反応を利用

してポリマー粒子を合成する方法の一つであり、通常、水、乳化剤（界面活性剤）、水溶性開始剤（油溶性も基本的には可）、モノマーの基本 4 成分から構成される液-液不均一系ラジカル重合である。NIPAM と架橋剤存在下、水中で乳化重合を行うと、まず NIPAM オリゴマーが生じる。その後 LCST 以上で疎水的となる NIPAM オリゴマーは、疎水的な界面活性剤ミセル内部へと侵入し、ミセル内部で重合が進行し粒子が形成される。

本研究では、上で説明した NIPAM の乳化重合を SWNT 存在下で行うことで、架橋 PNIPAM 被覆 SWNT の合成が可能になると考えた。架橋 PNIPAM 被覆 SWNT の合成においては、以下のような流れを考えている (**Scheme 2-1**)。①まず、SWNT を界面活性剤によって可溶化し、孤立分散させる。この可溶化溶液に、モノマーを添加し、そこに高温で反応開始剤を加えると、②反応開始剤が開裂し、オリゴマーラジカルへと成長する。このオリゴマーラジカルは、高温では相転移温度以上で疎水的となり、疎水的な界面活性剤ミセル内部空間へと入っていき、これにより重合の場を内部空間に制限することが出来ると予想している。そして③溶液中からのモノマー供給によってミセル内でラジカル重合が進み④架橋高分子による SWNT の表面被覆がなされることを期待している。重合後は界面活性剤を除去することで、表面が被覆された架橋高分子被覆 SWNT が得られると考えている。



Scheme 2-1. Model of the formation mechanism of SWNT coated with a cross-linked polymer.

2-2 実験

2-2-1. 使用試薬

- SWNT : As-produced HiPco SWNT (CNI)
- *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) (Wako)
- poly(ethyleneglycol) methacrylate (PEG-MA) ($M_n = 526$) (SIGMA-ALDRICH)
- *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) (Wako)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (SIGMA-ALDRICH)
- Ammonium persulfate (APS) (Wako)
- PL-PEG (DSPE-050PA) (SUNBRIGHT)

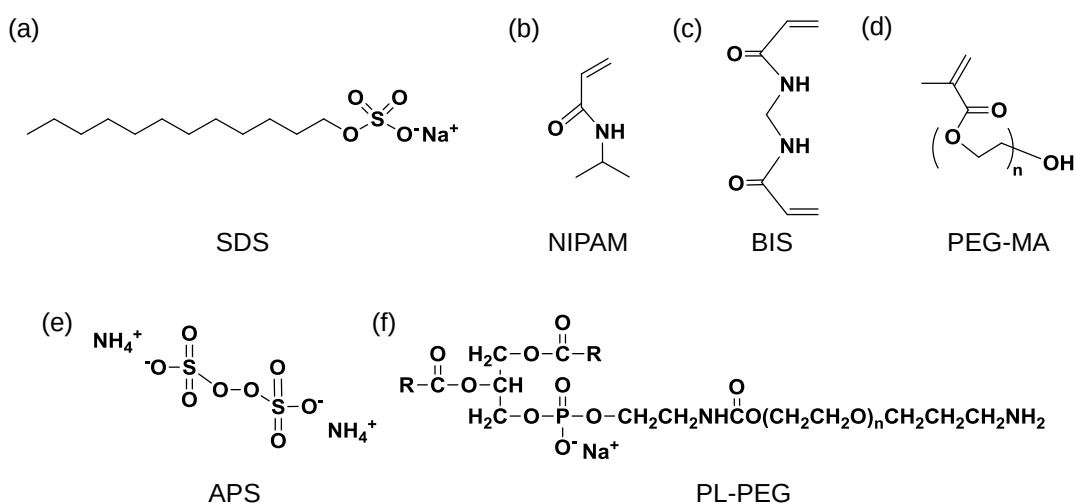


Figure 2-1. Chemical structures of (a) SDS, (b) NIPAM, (c) BIS, (d) PEG-MA, (e) APS and (f) PL-PEG.

2-2-2. 使用機器

- バス型ソニケーター (Branson5510)
- 遠心機 : himac CS150GX (日立工機株式会社)
- 冷却循環装置 : CA-1112 (東京理化工機)
- オイルバス : NWB-120N (NISSIN)
- マグネティックスターラー : HERACLES (KPI)
- UV-vis-NIR 分光光度計 : V-670 (日本分光)
- 粒径測定システム : ELSZ-2 (測定温度 : 25 °C) (大塚電子)
- ラマン分光光度計 (励起波長 785 nm) (Kaiser)
- 原子間力顕微鏡 (AFM) : Agilent 5500 (東陽テクニカ)
- 蛍光分光光源ユニット (堀場製作所)

- ・蛍光分光用試料室ユニット：NanoLog (堀場製作所)
- ・蛍光分光用蛍光側分光器：TRIA320 (堀場製作所)
- ・蛍光分光用検出器：Symphony (堀場製作所)
- ・X線光電子分光 (XPS)：AXIS-ULTRA DLD (Shimadzu)
- ・ ^1H NMR：AV 300 spectrometer (Bruker Biospin)
- ・凍結乾燥機 (FDU-1200) (東京理化器械)

2-2-3. 架橋 PNIPAM 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM) の合成と評価

SDS 160 mg を水 79.84 mL に溶解し、0.2 wt% SDS 水溶液を作製した。このうち、分取した 10 mL に SWNT 1 mg を加えたスクリー管を 6 本準備し、それぞれバス型ソニケーターによって 1 時間超音波処理を行った。その後 8 本のアングルローター用の遠心分離管 (4 mL) に 3 mL ずつ分けて、設定温度 25 °C、60000 *g* で 1 時間遠心分離する操作を 2 回繰り返し、上澄み液を集め、この上澄み液をさらに 30 分間バス型ソニケーターで超音波処理した。こうして調整した上澄み液 25 mL を、スターラーチップの入った三口フラスコに入れ、NIPAM 130 mg、BIS 10 mg を加えた (NIPAM : BIS = 18 : 1)。この混合溶液を攪拌しながら、室温で 1 時間窒素バブリングを行った。続いて、20 wt% APS 水溶液を 29 μL 加え、窒素雰囲気下 70 °C で、7 時間反応を進めた。重合後の溶液は綿ろ過を行い、凝集物を取り除いた。この重合後の溶液から、SDS および未反応モノマーを除去するため攪拌型ウルトラホルダー (MWCO : 10000、ADVANTEC) に加え 7 回ろ過を行った。この溶液をろ過後の溶液とし、SDS を除去出来たか調べるため、凍結乾燥後に XPS 測定を行った。さらに、ろ過後の溶液に対して設定温度 25 °C、120000 *g* で 30 分間遠心分離し、上澄み液を分取後、残った沈殿物に milliQ 水 1 mL を加え超音波照射を 1 分ほど行い再分散溶液を得た。上記で得られたろ過後の溶液および再分散溶液に対し DLS による粒径分布測定、AFM 測定、PL 測定、吸収スペクトル測定、ラマンスペクトル測定を行い評価した。

2-2-4. 架橋 PNIPAM/PEG 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM-PEG) の合成と評価

架橋 PNIPAM/PEG 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM-PEG) の合成は、共重合モノマーとして PEG-MA を NIPAM : PEG-MA = 100 : 14 (mol%) となるように (2-2-3 と同スケールの場合、NIPAM 114 mg、PEG-MA 67.2 μL) 添加し、2-2-3 と同様の操作で行った。その後精製のため設定温度 25 °C、120000 *g* で 30 分間遠心分離し、上澄み液を分取後、残った沈殿物に milliQ 水 1 mL を加え超音波処理を 1 分ほど行い再分散溶液を得た。得られた再分散溶液に対して ^1H NMR スペクトル測定、DLS による粒径分布測定、AFM 測定、PL 測定、吸収スペクトル測定を行い評価した。また、SWNT/PNIPAM と分散安定性を比較するため、スターラーチップを入れた 1 cm セルに SWNT/PNIPAM 再分散溶液、SWNT/PNIPAM-PEG 再分散溶液をそれぞれ加え、攪拌しながら 25 °C から 70 °C まで 5 °C ずつ上昇させながら吸収スペクトル測定を行った。

2-2-5. 架橋 PNIPAM-PEG 層の被覆安定性評価

以下に示す実験を通して架橋 PNIPAM-PEG 層の被覆安定性評価を行った。

2-2-5-1. 凍結乾燥・再分散後の評価

SWNT/PNIPAM-PEG を 20 mL スクリュー管に 1 mL 分取し、一晚 (24 h) 凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、スクリュー管に milliQ 水を 1 mL 加え超音波照射を 2 分間行い、再分散操作を行った。再分散後の溶液は吸収スペクトル測定を行い、SWNT の分散状態を評価した。

2-2-5-2. SDS との置換による分散剤脱離誘起後の評価

比較として用いるため、生体内への応用に向け最も研究されている SWNT 複合体：SWNT/phospholipid-PEG (PL-PEG) の合成を Liu らの文献²⁵に従って行った。

SWNT 2.7 mg、PL-PEG 13.5 mg、milliQ 水 13.5 mL を加えた 50 mL スクリュー管を準備し、バス型ソニケーターによって 1 時間超音波処理を行った。その後、溶液をエッペンチューブに分け、設定温度 25 °C、24000 g で 6 時間遠心分離を行った。得られた上澄み液から溶液中のフリーの PL-PEG を除去するために攪拌型ウルトラホルダー (MWCO : 200000、ADVANTEC) に加え 7 回ろ過を行い、4 倍希釈し SWNT/PL-PEG 可溶化溶液とした。この SWNT/PL-PEG 可溶化溶液に対して吸収スペクトル測定を行い評価した。

次に、SWNT/PL-PEG 可溶化溶液および SWNT/PNIPAM-PEG 再分散溶液各 1 mL にそれぞれ SDS 10 mg を添加し (溶液中の SDS 濃度 : 約 1 wt%)、60 分後にそれぞれ吸収スペクトル測定を行った。続いて、SDS 添加後の SWNT/PL-PEG 可溶化溶液と SWNT/PNIPAM-PEG 再分散溶液をそれぞれ濃縮フィルター (ADVANTEC, MWCO : 200000) に加え加圧して溶液をろ過した。溶液が 8 割程度落ちたら 1 wt% SDS 水溶液を 1 mL 加え再分散させた。この操作を 5 回繰り返し SWNT 表面上での分散剤の置換を積極的に誘起させた後、吸収スペクトル測定を行った。さらに各溶液を再び濃縮フィルター (ADVANTEC, MWCO : 200000) に加え加圧して溶液をろ過し、溶液が 8 割程度落ちたら milliQ 水 1 mL を加え再分散させた。1、3 回再分散後の SWNT/PNIPAM-PEG 溶液に対して吸収スペクトル測定を行った。

2-3. 結果・考察

2-3-1. 架橋 PNIPAM 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM) の合成と評価

Figure 2-2 (a)にろ過後の溶液の写真を示す。分散剤である SDS を除去した後であっても SWNT の凝集は見られず、SWNT は分散状態を維持していた。一方で、反応開始剤 APS 無し、架橋剤 BIS 無しの条件で作製したサンプルの写真をそれぞれ Figure 2-2 (b), (c)に示す。「反応開始剤無し」と「架橋剤無し」では、ろ過により SDS を除去すると SWNT の凝集体が生じ、再分散させることが出来なかった。以上の結果より、PNIPAM の「架橋構造」の形成が SWNT の安定な分散に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

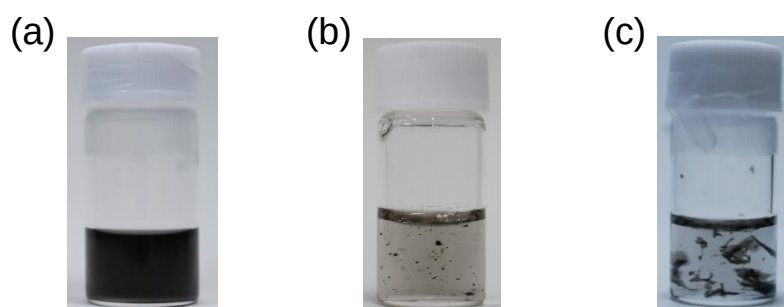


Figure 2-2. Photographs of the SWNT dispersions after the filtration obtained by the polymerization of NIPAM in the presence of (a) both initiator and cross-linker, (b) only cross-linker and (c) initiator. This data is taken from ref. 16.

Figure 2-3 にろ過前後の SWNT/PNIPAM に対して XPS 測定を行った結果を示す。Figure 2-3 (b)より、ろ過を行う前は SDS 由来の S_{2p} 、 S_{2s} のピークが観察されたのに対し、ろ過後ではそれらのピークが消失していた。survey scan (Figure 2-3 (a)) では N_{1s} 、 O_{1s} のピーク (NIPAM 由来) がそれぞれ観察されたことから、カーボンテープではなくサンプルをしっかりと測定できていることがわかる。したがって、ろ過により SDS を除去できていることが確認できた。

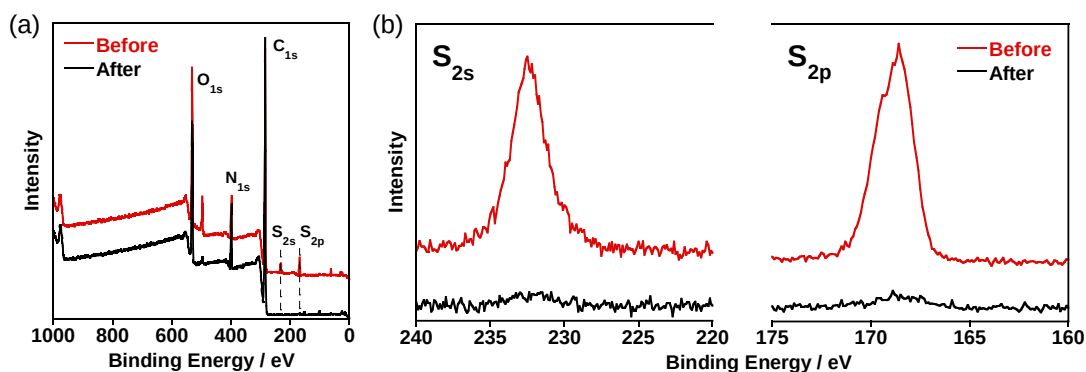


Figure 2-3. (a) XPS survey scans of SWNT/PNIPAM before (red line) and after the filtration (black line). (b) XPS narrow scans of SWNT/PNIPAM for the S_{2s} and S_{2p} regions before (red line) and after the filtration (black line). These data are taken from ref. 16.

次に、SWNT/PNIPAM の形状分析を AFM 測定、DLS による粒径分布測定により行った。**Figure 2-4 (a), (b)**にろ過後の SWNT/PNIPAM 溶液に対して AFM 測定、DLS による粒径分布測定を行った結果を示す。AFM 像では SWNT/PNIPAM と思われる棒状の物体に加え、球状の物体がいくつか見られた。また粒径分布では 25 nm 付近と 210 nm 付近にピークを有する多分散の分布が得られた。以上の結果より、今回合成した SWNT/PNIPAM 溶液中には棒状の SWNT/PNIPAM と球状粒子の 2 種類が存在していることがわかった。PNIPAM の乳化重合は SWNT の存在の有無に関わらず起こると考えられるので、球状粒子は SWNT を含まないフリーのミセル内部で形成された PNIPAM 粒子であると思われる。この PNIPAM 粒子が AFM 像では粒状粒子として観察され、粒径分布では 25 nm 付近の分布として現れていると思われた。

興味深いことに、ろ過後の SWNT/PNIPAM 溶液に対して 120000 g で超遠心分離を行うと、球状の PNIPAM 粒子を上澄みに残したまま SWNT/PNIPAM を優先的に沈殿できることを発見した。この操作により、SWNT/PNIPAM の精製が可能である。**Figure 2-4 (c), (d)**に再分散後の SWNT/PNIPAM 溶液に対して AFM 測定、DLS による粒径分布測定を行った結果を示す。AFM 像では、遠心前と異なり棒状粒子が多数観察された。この棒状粒子は、SWNT の周りが架橋 PNIPAM で被覆されたものであると考えられる。AFM 像に基づく高さ解析の結果、観察された棒状粒子の平均高さは 3.05 nm (N = 59) であることがわかった。本研究で用いた SWNT の直径がおおよそ 1 nm であることを考えると、SWNT 周囲に被覆している架橋 PNIPAM の厚さはおおよそ 1 nm であると思われ、SWNT は極薄のポリマー層で被覆されていた。続いて得られた粒径分布を見ると、SWNT/PNIPAM に由来すると考えられる 210 nm 付近の分布は変わらず、PNIPAM 粒子に由来すると思われる 25 nm 付近の分布のみが消えた。一方で、遠心後に得られた上澄み液に対して DLS による粒径分布測定を行うと、25 nm 付近により大きな強度を持つ分布が得られた (**Figure 2-5**)。以上の結果より、超遠心分離を行うと SWNT/PNIPAM を優先的に沈殿でき、精製が可能であることを確認できた。SWNT/PNIPAM では SWNT の内包により密度が増えたために沈殿しやすくなったと考えられる。以降は、再分散後（精製後）の SWNT/PNIPAM 溶液に対して評価を行っている。

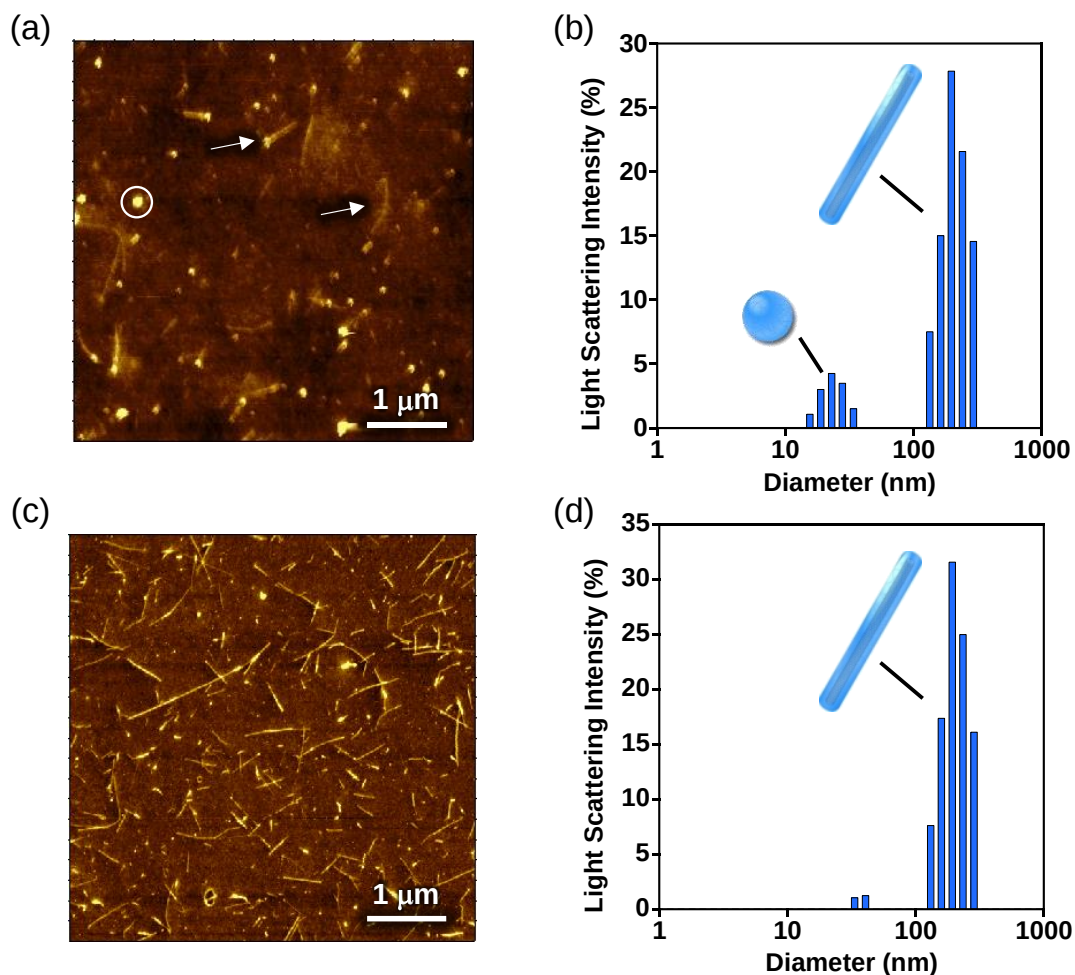


Figure 2-4. (a, c) AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}$) and (b, d) DLS histograms of SWNT/PNIPAM in an aqueous solution after (a, b) filtration and (c, d) ultracentrifugation at 120000 g for 0.5 h.

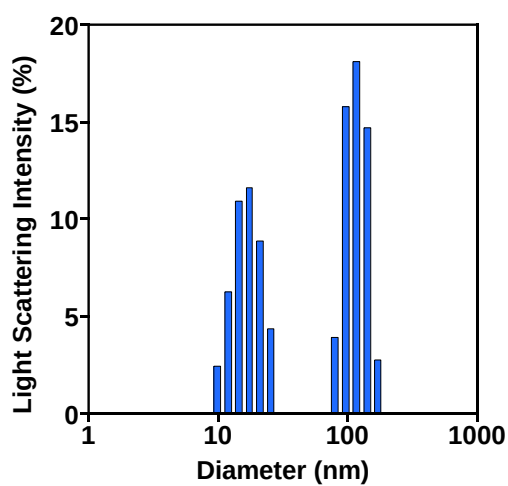


Figure 2-5. DLS histogram of the supernatant solution of SWNT/PNIPAM after the centrifugation at 120000 g for 0.5 h.

Figure 2-6 には再分散後の SWNT/PNIPAM 溶液のラマンスペクトル（青線）を示す。比較として SWNT/0.2 wt% SDS 可溶化溶液のラマンスペクトル（赤線）も示している。1600 cm^{-1} 付近に存在するピークは G-band と呼ばれグラファイト構造に由来し、1300 cm^{-1} 付近に存在する D-band と呼ばれるピークは CNT の欠陥に由来しているため、G-band のピーク面積に対する D-band のピーク面積を比較することで欠陥の存在量を評価することが出来る²⁶。

Figure 2-6 より、SWNT/PNIPAM を合成後でも D-band はほとんど増加していないことがわかり、合成により欠陥はほとんど導入されないことが明らかとなった。また、G-band のピーク面積に対する D-band のピーク面積 (I_D/I_G) (I_D/I_G が大きいほど、欠陥が多く存在していることになる) を計算すると、合成前後で共に $I_D/I_G = 0.0384$ となった。SWNT/0.2 wt% SDS 可溶化溶液では溶液中に大量に存在している SDS の影響でバックグラウンドが上昇してしまい、うまく計算出来ていないと思われる。しかしながら、比較として示した、化学修飾（ジアゾニウム処理）により孤立分散させた SWNT のラマンスペクトル (**Figure 2-7**)²⁷ と比べると明らかに D-band は小さいことがわかり、本手法では化学修飾に比べて非常に少ない欠陥導入量で SWNT の分散が可能であることがわかった。

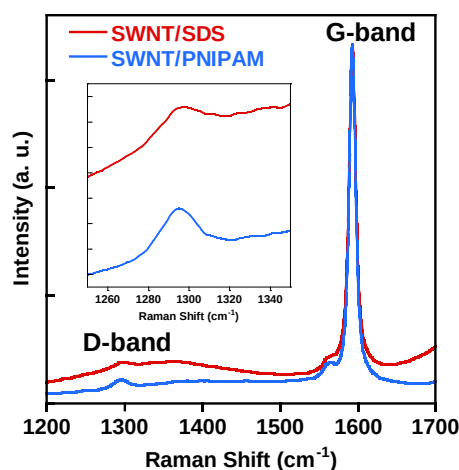


Figure 2-6. Raman spectra of the SWNTs solubilized in SDS aqueous solution (red line) and SWNT/PNIPAM in an aqueous solution (blue line).

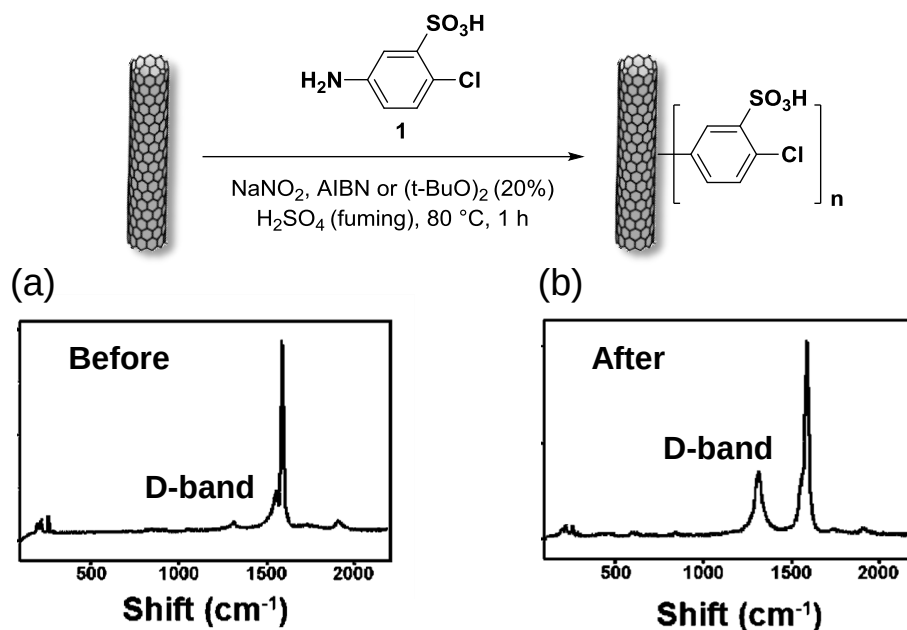


Figure 2-7. Raman spectra of the SWNTs (a) before and (b) after the functionalization with diazonium 1.

Figure 2-8 (a)に再分散後の SWNT/PNIPAM 溶液に対して PL マッピング測定を行った結果を示す。PL マッピングでは SWNT に由来する発光が観察された。PL は SWNT 表面構造が維持され、かつ SWNT が孤立分散している場合のみ観察される^{28, 29} ので、SWNT は SWNT/PNIPAM 中で孤立分散状態で存在していることがわかった。合成により表面に欠陥があまり導入されなかった (D-band がほとんど増加しなかった) ことも大きく影響していると考えられる。

Figure 2-8 (b)には再分散した SWNT/PNIPAM 溶液の吸収スペクトル (青線) を示す。比較として NIPAM、BIS 添加前 (赤線) と添加後 (緑線) の SWNT/0.2 wt% SDS 可溶化溶液の吸収スペクトルも示している。再分散した SWNT/PNIPAM 溶液の吸光度の値から、SWNT の収率は約 60% であると見積もられた。また、近赤外領域において SWNT 由来のシャープなピークが観察された。SWNT が凝集してしまうとピークはブロード化することが知られている²⁸ ため、吸収スペクトルからも SWNT の孤立分散を支持する結果が得られた。さらに、SWNT/SDS 可溶化溶液と比較して、PNIPAM で被覆された後では SWNT 由来の吸収ピークが 25 nm ほど長波長側にシフトしていた。これは、SWNT 表面が SDS から PNIPAM へと変換し、SWNT 周囲の誘電率が変化したために生じた^{30, 31} と考えられる。NIPAM と BIS を添加した場合にはシフトわずか (約 5 nm) しかは観察されなかったため、SWNT 周囲の環境の変化は重合後に生じていると考えられた。

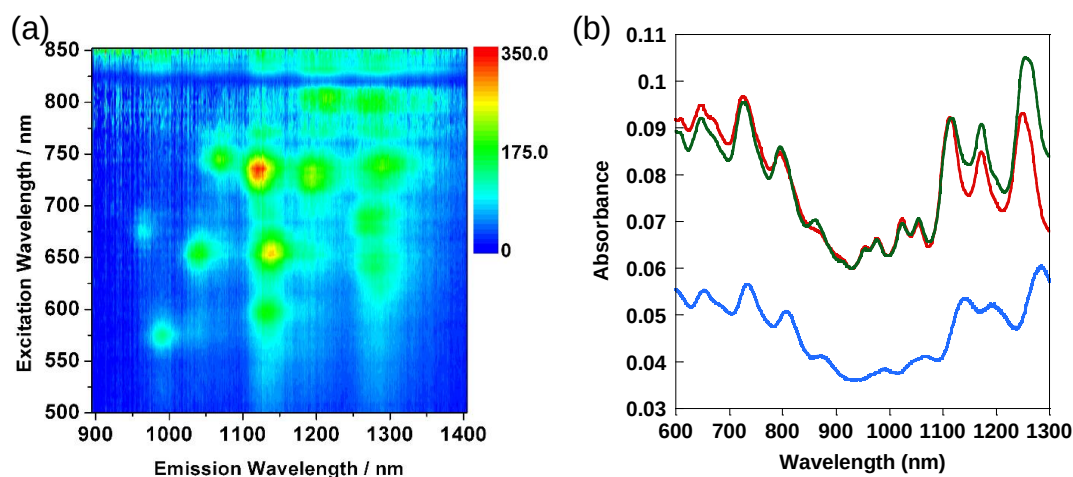


Figure 2-8. (a) PL mapping of SWNT/PNIPAM in an aqueous solution after the centrifugation at 120000 g for 0.5 h. (b) Absorption spectra of the SWNTs solubilized in SDS aqueous solution before (red line) and after the addition of the monomer and cross-linker (green line) and SWNT/PNIPAM in aqueous solution (blue line). These data are taken from ref. 16.

PNIPAM の LCST が 32°C 付近であることを考えると、上記の吸収スペクトル測定の結果より SWNT/PNIPAM の合成は **Figure 2-9** のように進んでいると考えられる。まず (i) 70°C で NIPAM オリゴマーが親水性から疎水性へと相転移し、(ii) 疎水性になった NIPAM オリゴマーが SWNT を含んだミセル内部空間へと侵入後、溶液中からのモノマー、架橋剤の供給により架橋 PNIPAM 層が形成される。

モノマーがミセル内部に最初から存在し、反応開始剤がミセル内に侵入することで架橋 PNIPAM 層が形成するメカニズムも考えられるが、吸収スペクトル測定の結果よりモノマーは SWNT を含むミセル内にはあまり存在していないと思われるため、**Figure 2-9** のようなメカニズムが優位に起こっていると考えられる。

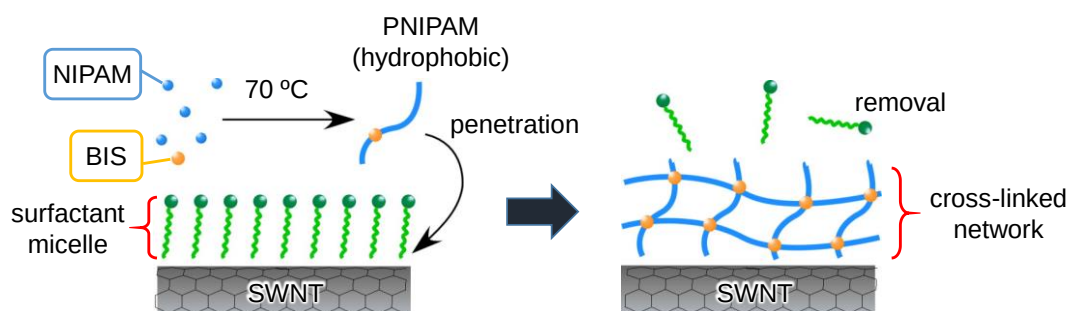


Figure 2-9. Schematic model for the formation of a cross-linked network around the SWNT using the interior of a surfactant micelle. This illustration is taken from ref. 16.

以上の結果より、新規複合体である SWNT/PNIPAM の作製に成功したと判断した。以降は、遠心分離・再分散操作により精製した複合体を SWNT/PNIPAM として表記している。

2-3-2. 架橋 PNIPAM/PEG 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM-PEG) の合成と評価

2-3-1 節では新規複合体である SWNT/PNIPAM を合成し、合成した SWNT/PNIPAM は SWNT 表面構造をほぼ維持したまま水中で安定な孤立分散を示すことを述べた。PNIPAM ナノ粒子の細胞毒性はほとんどないことが報告されている^{32, 33}ものの、血中においてタンパク質等の吸着が起こりやすい³⁴ことを考えると、SWNT/PNIPAM の血中滞留性は低いと思われる。そのため、SWNT/PNIPAM の生体応用に向け生体親和性の向上が求められる。そこで本節では、生体親和性の高い poly(ethyleneglycol) (PEG) の導入を試みる。PEG は主鎖エーテル酸素と水との水素結合により水和し、タンパク質や細胞などが非特異吸着しにくく、生体親和性が高いことが知られている³⁴。そのため、PEG の導入により生体内での安定な分散および生体親和性の向上の達成が期待できる。PEG の導入は、重合部位を有する poly(ethyleneglycol) methacrylate (PEG-MA) を NIPAM と共重合させることにより試みた (Figure 2-10)。

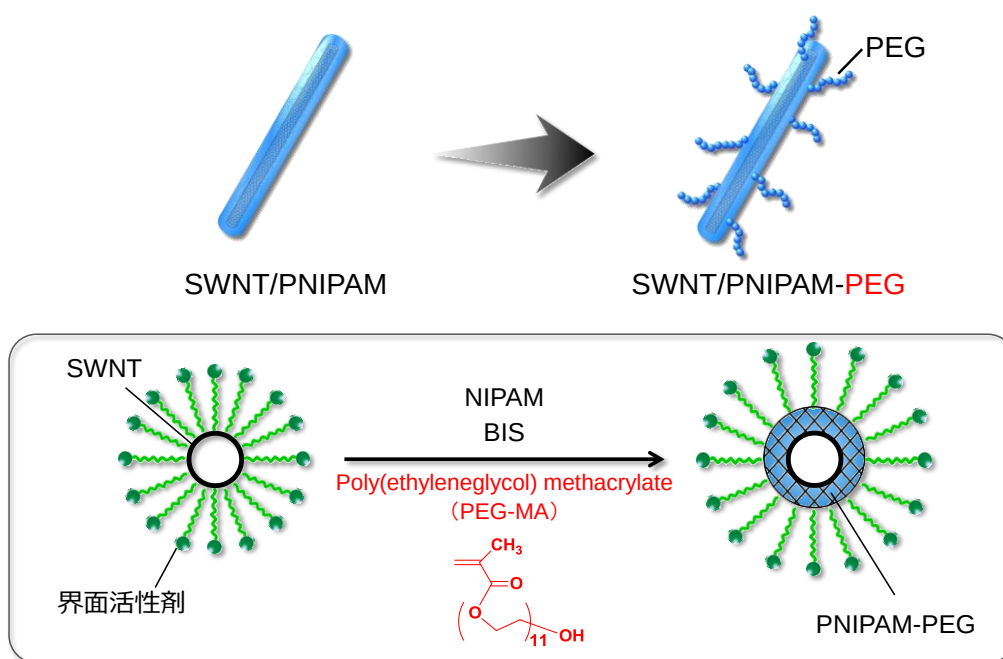


Figure 2-10. Schematic illustration for the preparation of SWNT/PNIPAM-PEG.

再分散後（精製後）の SWNT/PNIPAM-PEG 溶液の写真を **Figure2-11** に示す。凝集物の見られない黒色の液体が得られた。



Figure 2-11. Photograph of SWNT/PNIPAM-PEG after redispersion.

Figure 2-12 に SWNT/PNIPAM-PEG 溶液に対して ^1H NMR スペクトル測定を行った結果を示す。NIPAM のメチル基プロトンに由来するピークと PEG-MA のエチレンオキシドのメチレンプロトンに由来するピークが見られることから、NIPAM と PEG-MA の共重合に成功した。また、仕込み比は NIPAM : PEG-MA=100 : 14 であるのに対して SWNT/PNIPAM-PEG の重合比は NIPAM : PEG-MA=100 : 10.3 であることがわかった。

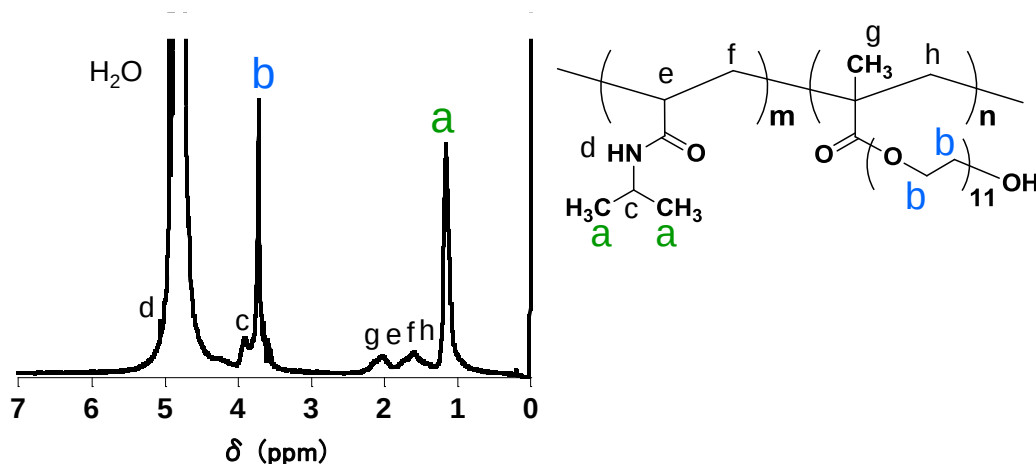


Figure 2-12. ^1H NMR spectrum of SWNT/PNIPAM-PEG (D_2O , 300 MHz).

Figure 2-13 に再分散後の SWNT/PNIPAM-PEG 溶液の AFM 測定、DLS による粒径分布測定の結果を示す。AFM 像では棒状粒子が多数観察された。この棒状粒子は、SWNT の周りが架橋 PNIPAM-PEG で被覆されたものであると考えられる。続いて得られた粒径分布を見ると、30 nm 付近と 300 nm 付近にピークを有する多分散の分布が得られた。SWNT/PNIPAM を合成した際に得られた結果（2-3-1 節）から考えると、30 nm 付近の分布は SWNT を含まないフリーのミセル内部で形成された PNIPAM-PEG 粒子であると思われ、300 nm 付近の分布は SWNT/PNIPAM-PEG に由来すると考えられた。今回は 30 nm 付近の分布はある程度大きく見られたものの、上澄み液の粒径分布（**Figure 2-14**）と比べると小さく、遠心分離により SWNT/PNIPAM-PEG が優先的に沈殿し精製が可能であることがわかった。

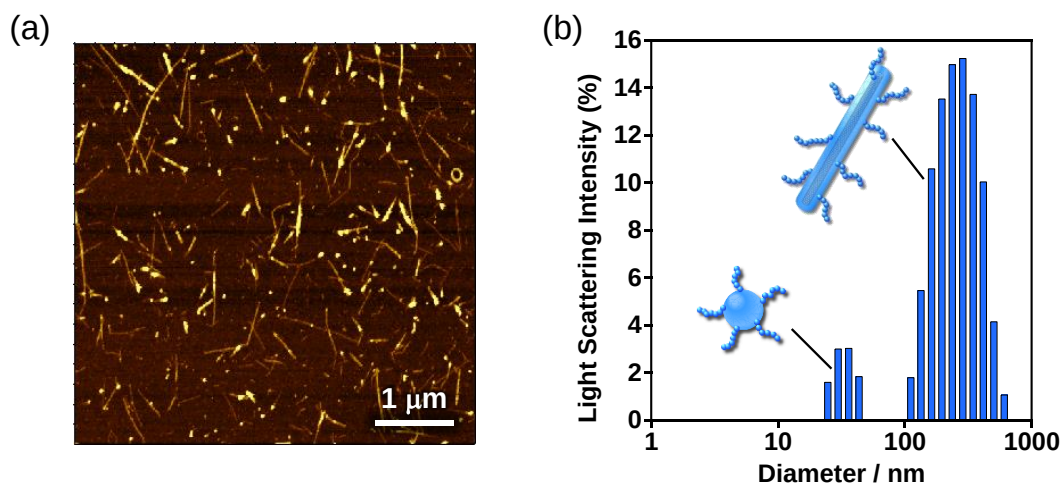


Figure 2-13. (a) AFM image ($5 \times 5 \mu\text{m}$) and (b) DLS histogram of SWNT/PNIPAM-PEG in an aqueous solution after the centrifugation at 120000 g for 0.5 h.

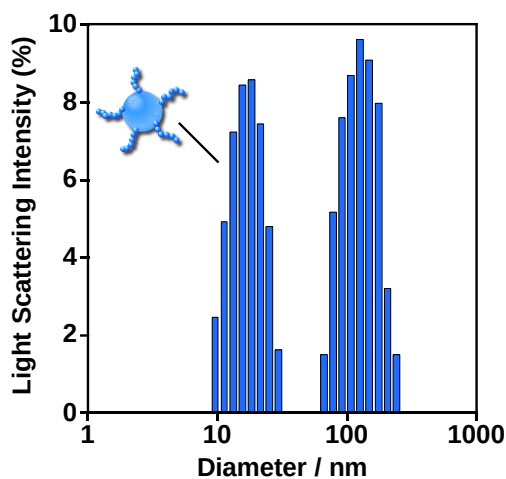


Figure 2-14. DLS histogram of the supernatant solution of SWNT/PNIPAM-PEG after the centrifugation at 120000 g for 0.5 h.

続いて、再分散後の SWNT/PNIPAM-PEG に対して光学特性評価を行った。再分散後の SWNT/PNIPAM-PEG 溶液に対して PL 測定、吸収スペクトル測定を行った結果を **Figure 2-15** に示す。PL マッピング (**Figure 2-15 (a)**) では SWNT に由来する発光が観察され、SWNT/PNIPAM-PEG 溶液中で SWNT は孤立分散状態で存在していることがわかった。**Figure 2-15 (b)**には再分散した SWNT/PNIPAM-PEG 溶液の吸収スペクトル (青線) を示す。比較として SWNT/0.2 wt% SDS 可溶化溶液の吸収スペクトル (赤線) も示している。近赤外領域において SWNT 由来のシャープなピークが観察されたため、吸収スペクトルからも SWNT の孤立分散を支持する結果が得られた。さらに、SWNT/PNIPAM と同様に、PNIPAM-

PEG で被覆された後では SWNT/SDS 可溶化溶液と比較して SWNT 由来の吸収ピークが 30 nm ほど長波長側にシフトしていた。これも、SWNT 表面が SDS から PNIPAM-PEG へと変化した、SWNT 周囲の誘電率が変化したために生じたと考えられる。

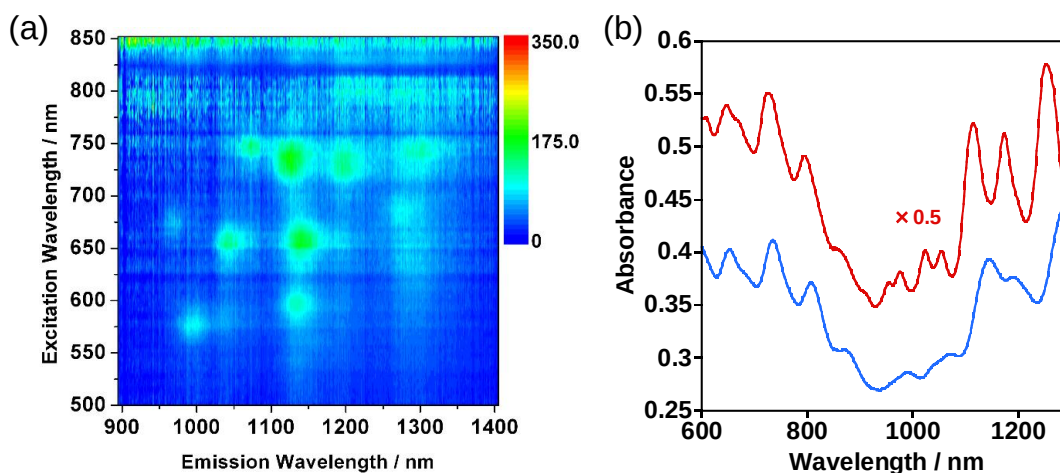


Figure 2-15. (a) PL mapping of SWNT/PNIPAM-PEG in an aqueous solution after the centrifugation at 120000 g for 0.5 h. (b) Absorption spectra of SWNTs solubilized in SDS aqueous solution (red line) and SWNT/PNIPAM-PEG in an aqueous solution (blue line). These data are taken from ref. 16.

Figure 2-16 に温度上昇時の SWNT/PNIPAM 溶液、SWNT/PNIPAM-PEG 溶液の吸収スペクトル測定の結果を示す。SWNT/PNIPAM 溶液では、温度が上昇すると短波長側の吸光度が大きくなっていく挙動が見られた。これは、PNIPAM が相転移し疎水性となったことで複合体同士の凝集が生じ、散乱が起こったためであると思われる。また、PNIPAM の相転移は一般的に 32 °C 付近で起こるが、今回の測定では 45 °C 付近から吸光度が大きくなり始めた。この原因としては、温度上昇時の勾配が大きく (2 °C/min)、さらに各温度に達してから測定までの待ち時間が短かった (1 min) ためセルホルダーの温度と溶液の温度にズレが生じていた可能性が考えられる。また、SWNT 上に存在する非常に薄い PNIPAM 層の場合、そもそも LCST が 32 °C 付近にない可能性も考えられる。一方、SWNT/PNIPAM-PEG 溶液では温度が上昇しても吸光度の変化は観察されなかった。これは、架橋 PNIPAM-PEG 層の LCST が共重合により変化し、LCST が 70 °C 以上になったからであると考えられた。以上より、SWNT/PNIPAM は温度変化に伴い凝集の形成が起こるのに対し、SWNT/PNIPAM-PEG は 70 °C まで安定に分散することがわかった。この高い分散安定性は、光熱治療などの生体応用を考えた場合に非常に重要である。

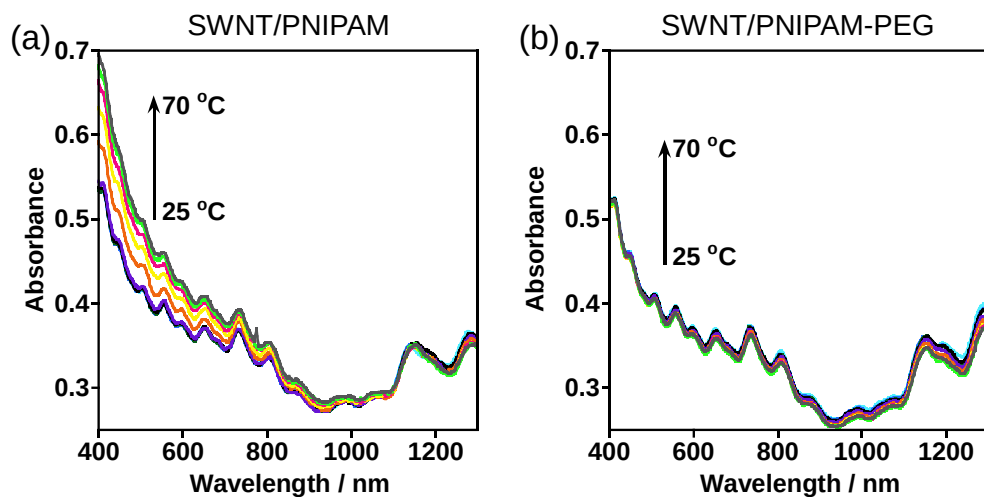


Figure 2-16. Absorption spectra of (a) SWNT/PNIPAM and (b) SWNT/PNIPAM-PEG in an aqueous solution at given temperatures. These data are taken from ref. 16.

以上の結果より、SWNT/PNIPAM-PEG の作製に成功したと判断した。また、本節を通して、SWNT 表面上の架橋高分子層の機能化は、共重合により容易に行えることが明らかとなった。以降は、遠心分離・再分散操作により精製した複合体を SWNT/PNIPAM-PEG として表記している。

2-3-3. 架橋 PNIPAM-PEG 層の被覆安定性評価

2-3-3-1. 凍結乾燥・再分散後の評価

SWNT/ポリマー複合体において、SWNT 表面上のポリマーの被覆安定性はしばしば凍結乾燥・再分散操作により評価される^{3,5}。本研究においては、凍結乾燥・再分散操作を行っても PNIPAM-PEG 層の被覆安定性が維持できるとわかれば、SWNT/PNIPAM-PEG を溶液状態で保存する必要は無く、凍結乾燥させておき使用する直前に再分散させることが可能である。そのため、SWNT/PNIPAM-PEG の持ち運びを容易に出来、応用の幅が広がる。

Figure 2-17 (a), (b)に凍結乾燥後の SWNT/PNIPAM-PEG と再分散後の溶液の写真を示す。凍結乾燥後の SWNT/PNIPAM-PEG は、milliQ 水を添加後わずか 2 分間の超音波照射で簡単に再分散可能であった。また、**Figure 2-17 (c)**には凍結乾燥前の溶液、および凍結乾燥後再分散した溶液の吸収スペクトルを示す。再分散後の溶液も非常にシャープなピークが見られ、凍結乾燥前のスペクトルと変化は観察されなかった。

この実験結果から、SWNT/ PNIPAM-PEG は凍結乾燥・再分散後も SWNT の分散状態を維持できることがわかり、PNIPAM-PEG 層は高い被覆安定性を有していることが示唆された。

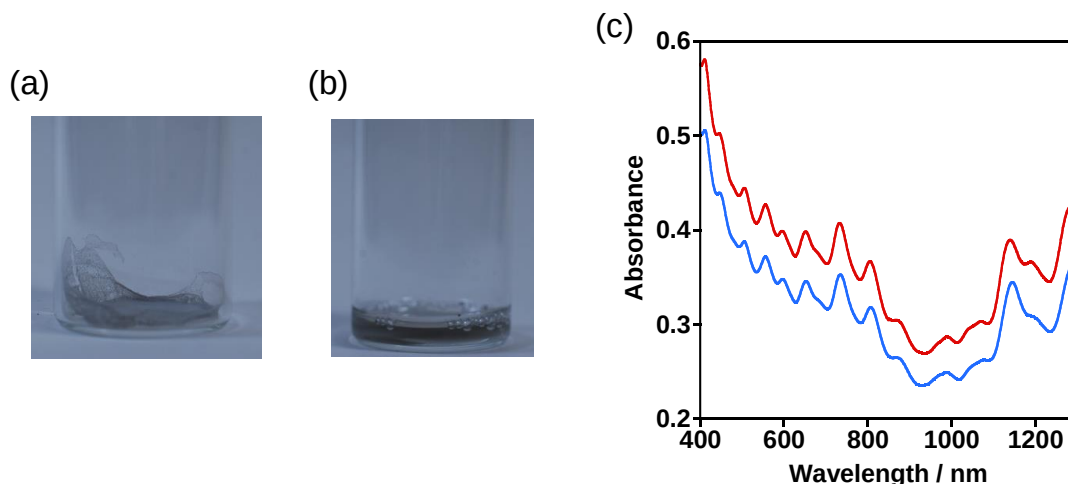


Figure 2-17. Photographs of SWNT/PNIPAM-PEG (a) after freeze-drying and (b) redispersion in water. (c) Absorption spectra of SWNT/PNIPAM-PEG before (red line) and after (blue line) the freeze-drying treatment. These data are taken from ref. 16.

2-3-3-2. SDS との置換による分散剤脱離誘起後の評価

1 章でも述べたが、物理修飾で分散した CNT 溶液に対して他の分散剤を大量に添加すると、「置換」に伴い CNT 表面上からの修飾分子の脱離が起こる。例えば、DNA で分散させた SWNT/DNA 可溶化溶液に対して界面活性剤であるコール酸ナトリウム (SC) を多量に加えた場合、SWNT 表面上で DNA と SC の「置換」が起こる (DNA の脱離が誘起される) ことが報告されている³⁵。そこで本研究では、SWNT/PNIPAM-PEG 溶液に過剰の界面活性剤 SDS を添加し、フィルター濾過・再分散を繰り返した場合に PNIPAM-PEG 層が被覆状態を維持できるかどうかを調べた。この評価は、SWNT の生体応用を考えた場合非常に重要である。なぜならば、生体内には SWNT と強く相互作用するタンパク質が存在し、実際の生体内でも SWNT 表面上で分散剤とタンパク質との「置換」が起こるからである³⁶。これら「置換」は SWNT の凝集を引き起こす恐れがあり、分散剤に機能性を付与していた場合にはその役割も果たせなくなってしまう。本節では、生体内のように大量の吸着物質が存在する環境を作るため、過剰の SDS を添加し被覆安定性を評価した。また、比較として生体内への応用に向け最も研究されている SWNT 複合体: SWNT/PL-PEG²⁵ に対しても同様の操作を行い、被覆安定性を評価した。

Figure 2-18 に SWNT/PL-PEG 可溶化溶液と SWNT/PNIPAM-PEG 溶液の吸収スペクトル測定の結果を示す。吸光度から溶液中の SWNT の濃度はほぼ同じであり、SWNT の各カイラリティを示すピークが見られていることからどちらも SWNT は孤立分散していると考えられた。

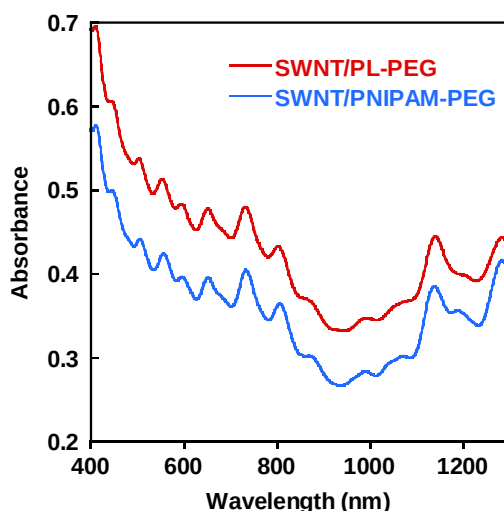


Figure 2-18. Absorption spectra of SWNT/PL-PEG (red line) and SWNT/PNIPAM-PEG (blue line) in aqueous solutions. The optical path is 1 cm.

続いて、**Figure 2-19** に 1 wt% SDS 水溶液で 5 回ろ過・再分散後、さらに milliQ 水で 3 回ろ過・再分散を行った後の各溶液と用いたフィルターの写真を示す (**Figure 2-19 (a), (b)**)。SWNT/PL-PEG 可溶化溶液ではろ過・再分散の度に再分散できない SWNT が増え、一連のろ過・再分散後には大量の SWNT の凝集物が生じた (**Figure 2-19 (a)**)。これは、まず SDS との置換で PL-PEG の脱離が起こり、その後 SDS を除去したことで SWNT の凝集が生じたからであると思われる (**Figure 2-19 (c)**)。一方、SWNT/PNIPAM-PEG 溶液では一連のろ過・再分散操作を行ってもフィルター上に凝集物は存在せず、再分散可能であることが分かった (**Figure 2-19 (b)**)。これは、SDS 添加後も PNIPAM-PEG 層は SWNT 表面を安定に被覆し、SDS を除去後も分散状態を維持できているからである (**Figure 2-19 (d)**)。以上の結果から、SWNT/PNIPAM-PEG は生体応用に向け研究されている SWNT/PL-PEG 複合体よりも高い被覆安定性を示すことが分かった。

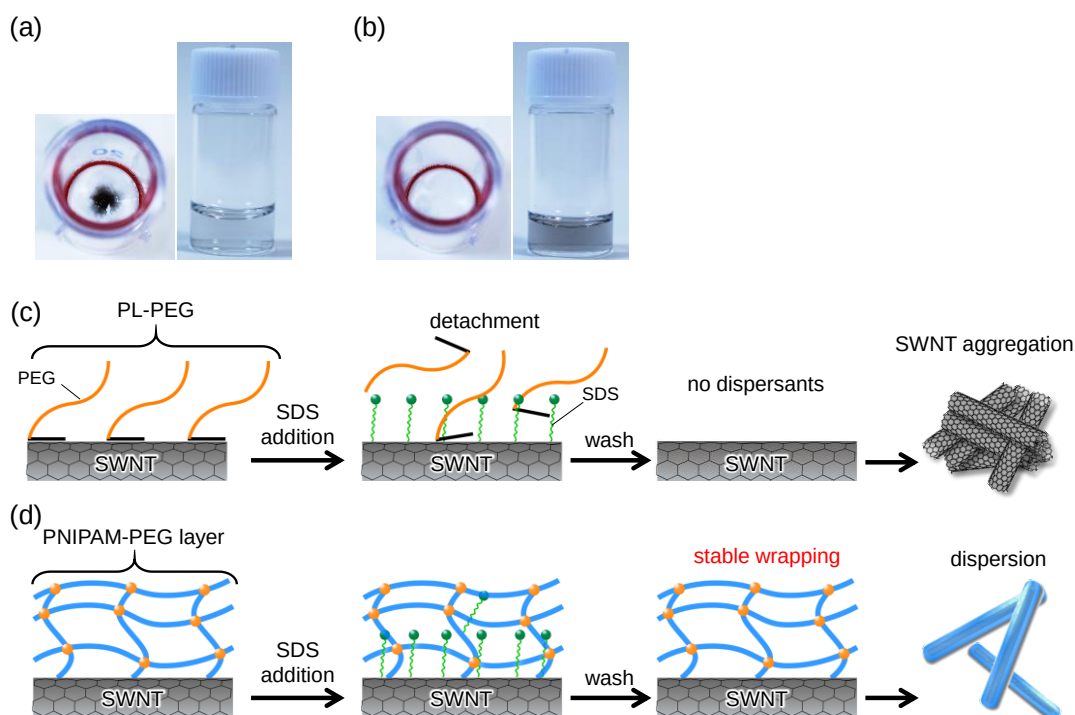


Figure 2-19. Photographs of (a) SWNT/PL-PEG and (b) SWNT/PNIPAM-PEG after filtration (left) and redispersion (right). Schematic illustration of proposed mechanisms of (c) the aggregation for SWNT/PL-PEG and (d) the stable dispersion for SWNT/PNIPAM-PEG.

Figure 2-20 には SWNT/PNIPAM-PEG 溶液に対して、一連のろ過・再分散操作で得られた溶液の吸収スペクトル測定の結果を示す。SDS 添加後では 3 nm ほど短波長シフトが見られた。SWNT を SDS で可溶化した場合には SWNT/PNIPAM-PEG よりも短波長にピークを持つスペクトルが得られる。そのため、今回 SDS 添加後に短波長シフトが起こったことは妥当な結果である。続いて、水でろ過・再分散を 3 回行った後ではピークは長波長シフトし、SDS を添加する前のスペクトルとピーク位置が一致した。これは、SWNT 表面上に吸着していた SDS が脱離したために生じたと言える。この結果は、架橋高分子層を介して SWNT 表面での物質の吸脱着が可能であることを示しており、SWNT/PNIPAM-PEG はドラッグキャリアとしての応用が期待できる材料であると言える。また、上でも述べたように SWNT/PL-PEG 可溶化溶液では再分散操作の度にフィルターから再分散出来る量が減ったため吸収スペクトル測定自体が困難であった。

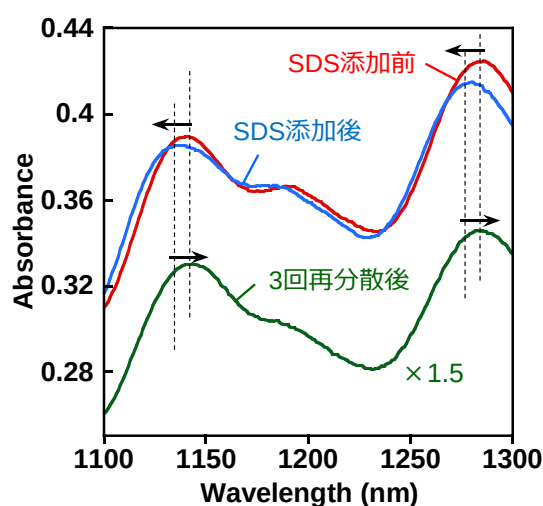


Figure 2-20. Absorption spectra of SWNT/PNIPAM-PEG in aqueous solutions before (red line) and after the addition of SDS (blue line). The spectrum after washing is also shown (green line).

2-4. まとめ

本章では、SWNT と界面活性剤ミセル間のナノ空間を「重合場」として利用し、「架橋高分子」を合成することによる新たな SWNT 表面修飾手法を開拓した。本手法で合成した架橋高分子被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM-PEG) は、SWNT 表面構造をほぼ維持したまま、加熱、凍結乾燥・再分散、多量の界面活性剤添加に対して高い被覆安定性を有することがわかった。この高い被覆安定性は、架橋高分子層を介した低分子の吸着・脱離をも可能にするため、SWNT/PNIPAM-PEG はドラッグキャリアとしての応用が期待できる。また、PNIPAM は SWNT と強い相互作用を有していない³⁷ため、本手法では SWNT と強い相互作用を持たないポリマーも利用可能であり、これまで作製が困難であった SWNT/ポリマー複合体の合成が可能になると思われる。さらには、本手法では共重合による架橋高分子層の機能化が可能であるため、蛍光色素やリガンドの導入により、がん診断・治療薬への応用に向けた複合体のデザインが可能である。

参考文献

1. G. M. Mutlu, G. R. Budinger, A. A. Green, D. Urich, S. Soberanes, S. E. Chiarella, G. F. Alheid, D. R. McCrimmon, I. Szleifer, M. C. Hersam, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1664.
2. Y. Kang, T. A. Taton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5650.
3. R. Wang, P. Cherukuri, J. G. Duque, T. K. Leeuw, M. K. Lackey, C. H. Moran, V. C. Moore, J. L. Conyers, R. E. Smalley, H. K. Schmidt, R. B. Weisman, P. S. Engel, *Carbon* **2007**, *45*, 2388.
4. K. E. Leach, H. N. Pedrosa, L. J. Carlson, T. D. Krauss, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 436.
5. T. H. Kim, C. Doe, S. R. Kline, S. M. Choi, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 929.
6. C. Doe, S.-M. Choi, S. R. Kline, H.-S. Jang, T.-H. Kim, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 2685.
7. C. Thauvin, S. Rickling, P. Schultz, H. Celia, S. Meunier, C. Mioskowski, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 743.
8. E. Contal, A. Morère, C. Thauvin, A. Perino, S. Meunier, C. Mioskowski, A. Wagner, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 5718.
9. C. d. Thauvin, A. l. Perino, E. Contal, E. Morin, P. Schultz, S. p. Meunier, A. Wagner, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 7319.
10. R. K. Wang, W. C. Chen, D. K. Campos, K. J. Ziegler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16330.
11. C. A. Silvera-Batista, R. K. Wang, P. Weinberg, K. J. Ziegler, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 6990.
12. S. K. Kreft, M. Å. Petersen, M. B. Nielsen, S. Reich, A. Setaro, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 15731.
13. C. Roquelet, J. S. Lauret, V. Alain-Rizzo, C. Voisin, R. Fleurier, M. Delarue, D. Garrot, A. Loiseau, P. Roussignol, J. A. Delaire, E. Deleporte, *Chemphyschem* **2010**, *11*, 1667.
14. W. C. Chen, R. K. Wang, K. J. Ziegler, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 1821.
15. G. Clavé, G. Delport, C. Roquelet, J.-S. Lauret, E. Deleporte, F. Vialla, B. Langlois, R. Parret, C. Voisin, P. Roussignol, B. Jousselmé, A. Gloter, O. Stephan, A. Filoramo, V. Derycke, S. Campidelli, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 2700.
16. Y. Tsutsumi, T. Fujigaya, N. Nakashima, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 6318.
17. T. Fujigaya, T. Morimoto, N. Nakashima, *Soft Matter* **2011**, *7*, 2647.
18. T. Fujigaya, T. Morimoto, Y. Niidome, N. Nakashima, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3610.
19. H. Ahmad, M. A. Rahman, M. A. J. Miah, K. Tauer, *Macromol. Res.* **2008**, *16*, 637.
20. S. R. Sershen, S. L. Westcott, N. J. Halas, J. L. West, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51*, 293.
21. X. Wu, R. H. Pelton, A. E. Hamielec, D. R. Woods, W. McPhee, *Colloid Polym. Sci.* **1994**, *272*, 467.
22. R. M. K. Ramanan, P. Chellamuthu, L. Tang, K. T. Nguyen, *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 118.
23. 蒲池幹治, 遠藤剛, 岡本佳男, 福田猛 監修, ラジカル重合ハンドブック, NTS **2010**.

24. 高分子学会 編, 基礎高分子科学, 東京化学同人 **2006**.
25. Z. Liu, S. M. Tabakman, Z. Chen, H. Dai, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1372.
26. T. J. Aitchison, M. Ginic-Markovic, J. G. Matison, G. P. Simon, P. M. Fredericks, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 2440.
27. J. L. Hudson, M. J. Casavant, J. M. Tour, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11158.
28. M. J. O'Connell, S. M. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman, R. E. Smalley, *Science* **2002**, *297*, 593.
29. C. Georgi, M. Böhmler, H. Qian, L. Novotny, A. Hartschuh, *Phys. Status Solidi B* **2009**, *246*, 2683.
30. S. Berger, F. Iglesias, P. Bonnet, C. Voisin, G. Cassabo, J.-S. Lauret, C. Delalande, P. Roussignol, *J. Appl. Phys.* **2009**, *105*, 094323.
31. S. Chiashi, S. Watanabe, T. Hanashima, Y. Homma, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3097.
32. H. Vihola, A. Laukkanen, L. Valtola, H. Tenhu, J. Hirvonen, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3055.
33. A. Wadajkar, B. Koppolu, M. Rahimi, K. Nguyen, *J. Nanopart. Res.* **2009**, *11*, 1375.
34. N. Gulati, R. Rastogi, A. K. Dinda, R. Saxena, V. Koul, *Colloids Surf., B* **2010**, *79*, 164.
35. Y. Kato, A. Inoue, Y. Niidome, N. Nakashima, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, article number 733.
36. P. Cherukuri, C. J. Gannon, T. K. Leeuw, H. K. Schmidt, R. E. Smalley, S. A. Curley, R. B. Weisman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 18882.
37. D. Wang, L. Chen, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1480.

3 章

架橋高分子被覆 SWNT 合成における必要条件の探索

3-1. 序

CNT は、電気伝導性、熱伝導性、機械的強度などで従来の物質にない優れた特性を有する¹。CNT のこれらの特性を利用するため、高分子との複合体は非常に多くの注目を集めている。例えば、SWNT の大きなヤング率 (0.64-1.0 TPa)、引っ張り強度 (150-180 GPa) および SWNT バンドルの高い電気伝導性 ($10^2 \sim 10^3$ S/cm) を利用するために高分子材料のフィラー (充填剤)^{2,3}や電子機器^{4,5}への応用、近赤外域での吸収・発光、光熱変換特性を利用したバイオ材料⁶への応用など様々な分野で研究されている。現在、CNT/高分子複合体を作製する方法としては、1 章で説明したように主に化学修飾と物理修飾の 2 つが存在する。化学修飾法としては、あらかじめ合成した高分子を CNT にグラフトさせる「グラフト導入 (grafting 'to') 法」、及び CNT から高分子鎖を成長させる「グラフト成長 (grafting 'from') 法」が試みられている。これらの方法は CNT に高い分散性を付与するが、CNT への欠陥導入による性能低下も引き起こすという問題を抱えている。一方、物理修飾では CNT 特有の性質は維持されるものの、被覆安定性の低さに起因した低い分散安定性という問題がある。これらの修飾法に対し、本研究で開発した「ミセル内部空間を重合場として利用した架橋高分子合成法」では、SWNT 表面に欠陥をほとんど導入せず、かつ高い被覆安定性を有する SWNT/高分子複合体を作製できることを 2 章で報告した。さらに本手法で注目すべき点は、用いる高分子と SWNT の間に相互作用は必要としない点である。実際、これまで複合体作製に用いてきた PNIPAM は SWNT との間に強い相互作用を持たないことが報告されている⁷。つまり、本手法では SWNT と強い相互作用を持たない高分子を用いた場合でも、SWNT に欠陥を導入せず、かつ高い被覆安定性を有する新規複合体の作製が可能である。

本章では、本手法を一般化するため様々なモノマーを用いて複合体作製を試み、どのような合成条件の時に架橋高分子被覆 SWNT の合成が可能であるか、合成のための必要条件を調査した⁸。必要条件が明らかとなれば、これまでに報告の無い様々な機能を有する SWNT/高分子複合体の合成が可能となり、バイオ分野を含め様々な用途への展開が期待される。

- ・ ラマン分光光度計（励起波長 785 nm） (Kaiser)
- ・ 原子間力顕微鏡（AFM）： Agilent 5500 (東陽テクニカ)
- ・ 原子間力顕微鏡（AFM）： SPM-9600 (Shimadzu)
- ・ プラズマクリーナー： CUTE-MP (FEMTO SCIENCE)
- ・ 走査透過型電子顕微鏡（STEM）： SU9000 (Hitachi High Technologies)

3-2-3. 様々な架橋高分子被覆 SWNT（7 種類）の合成

・ Poly(PEG-MA)被覆 SWNT（SWNT/PPEG）の合成

SDS 160 mg を水 79.84 mL に溶解し、0.2 wt% SDS 水溶液を調製した。このうち、分取した 10 mL に SWNT 1 mg を加えたスクリー管を 6 本準備し、それぞれバス型ソニケーターによって 1 時間超音波処理を行った。その後 8 本のアングルローター用の遠心分離管（4 mL）に 3.4 mL ずつ分けて、設定温度 25 °C、60000 g で 1 時間遠心分離する操作を 2 回繰り返し、上澄み液を集め、この上澄み液をさらに 30 分間バス型ソニケーターで超音波処理した。こうして調製した上澄み液（約 45 mL）から 5 mL を分取し、スターラーチップの入った二口フラスコに入れ、PEG-MA 110 μ L（0.23 mmol）、BIS 2.0 mg（ 1.3×10^{-2} mol）を加えた（PEG-MA : BIS = 18 : 1）。この混合溶液を攪拌しながら、室温で 1 時間窒素バブリングを行った。続いて、2.5 wt% APS 水溶液を 47 μ L 加え、窒素雰囲気下 70 °C で、7 時間反応を進めた。重合後の溶液は綿ろ過を行い、凝集物を取り除いた。この重合後の溶液から、SDS および未反応モノマーを除去するため攪拌型ウルトラホルダー（MWCO : 10000、ADVANTEC）に加え 7 回ろ過・再分散（1st filtration）を行った。続いて、ろ過・再分散操作で生じた凝集物を除去するため、綿ろ過（2nd filtration）を行った。回収した溶液を poly(PEG-MA)被覆 SWNT（SWNT/PPEG）とし、SDS および未反応モノマーを除去出来たか調べるため ¹H NMR スペクトル測定を行った。さらに、DLS による粒径分布測定、吸収スペクトル測定、AFM 測定、ラマンスペクトル測定を行い評価した。

Figure 3-1 で示した他の 6 つのモノマーを用いた場合も、上記と同様の操作で架橋高分子被覆 SWNT を合成した。全て仕込み比はモノマー : 架橋剤 BIS = 18 : 1 である。合成した各架橋高分子被覆 SWNT 溶液に対して DLS による粒径分布測定、吸収スペクトル測定、AFM 測定およびラマンスペクトル測定を行い評価した。

3-2-4. 合成における必要条件の探索（モノマー添加後の吸収スペクトル測定）

SDS 140 mg を水 69.86 mL に溶解し、0.2 wt% SDS 水溶液を調製した。この 0.2 wt% SDS 水溶液 10 mL に SWNT 1 mg を加えたスクリー管を 6 本準備し、それぞれバス型ソニケーターで 1 時間超音波処理を行った。その後 8 本のアングルローター用の遠心分離管（4 mL）に 3.4 mL ずつ分けて、設定温度 25 °C、60000 g で 1 時間遠心分離する操作を 2 回繰り返し、上層から 90%程度を上澄み液として集めた。続いてこの上澄み液を 2 つのスクリー管（50 mL）に分け、さらに 30 分間バス型ソニケーターで超音波処理後、スクリー

管（110 mL）にまとめた。上記の操作で得られた SWNT/0.2 wt% SDS 可溶化溶液を 5 mL ずつに分け、**Figure 3-1** で示した 7 つのモノマーをそれぞれ等モル量添加し、5 分間同じ速度で攪拌後、吸収スペクトル測定を行った。（使用したモノマーの添加量は、PEG-MA 110 μL 、DMAAm 23.75 μL 、MMA 24.5 μL 、VA 21.25 μL 、MA 20.75 μL 、AAm 16.4 mg、HEMA 28 μL である。）

3-2-5. 合成における必要条件の探索（ミセル内での粒子形成の可否を観察）

3-2-3 節で合成した SWNT/PHEMA 2 mL に対して 10000 g で 30 分間遠心分離を行い凝集物を沈殿させ、上澄み液を回収した。この上澄み液をマイカ基板上に滴下後、1 分間スピコート（slope 10 s, 3000 rpm 50 s）後に、窒素ブローを行い AFM 測定を行った。さらに、3-2-3 節で合成した SWNT/PPEG、SWNT/PDMAAm 各 1 mL に対して 600000 g で 30 分間遠心分離を行い（**Figure 3-2**）、得られた上澄み液を TEM grid に一滴滴下して STEM 測定を行った。また、上澄み液に対して DLS による粒径分布測定も行った。遠心分離を行ったのは、各架橋高分子被覆 SWNT を沈殿させ、SWNT を含まないナノ粒子を観察しやすくするためである。

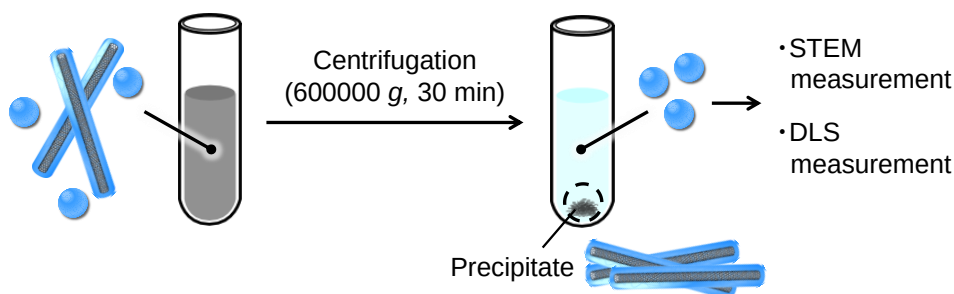


Figure 3-2. Schematic illustration for the procedure of the preparation of supernatants from SWNT/PPEG and SWNT/PDMAAm.

3-3. 結果・考察

3-3-1. 様々な架橋高分子被覆 SWNT (7 種類) の合成

Figure 3-3 に、合成した各架橋高分子被覆 SWNT 溶液の写真を示す。SWNT/PPEG、poly(DMAAm)被覆 SWNT (SWNT/PDMAAm)、poly(MMA)被覆 SWNT (SWNT/PMMA)、poly(VA)被覆 SWNT (SWNT/PVA)、poly(MA)被覆 SWNT (SWNT/PMA) では濃い黒色の溶液が得られた。一方で、poly(AAm)被覆 SWNT (SWNT/PAAm) では薄い黒色の溶液が得られた (**Figure 3-3 (f)**)。さらに、poly(HEMA)被覆 SWNT (SWNT/PHEMA) の合成を試みた場合には、大量の凝集物の形成が観察された (**Figure 3-3 (g)**)。したがって、孤立分散した SWNT/PHEMA の合成は困難であるとわかった。

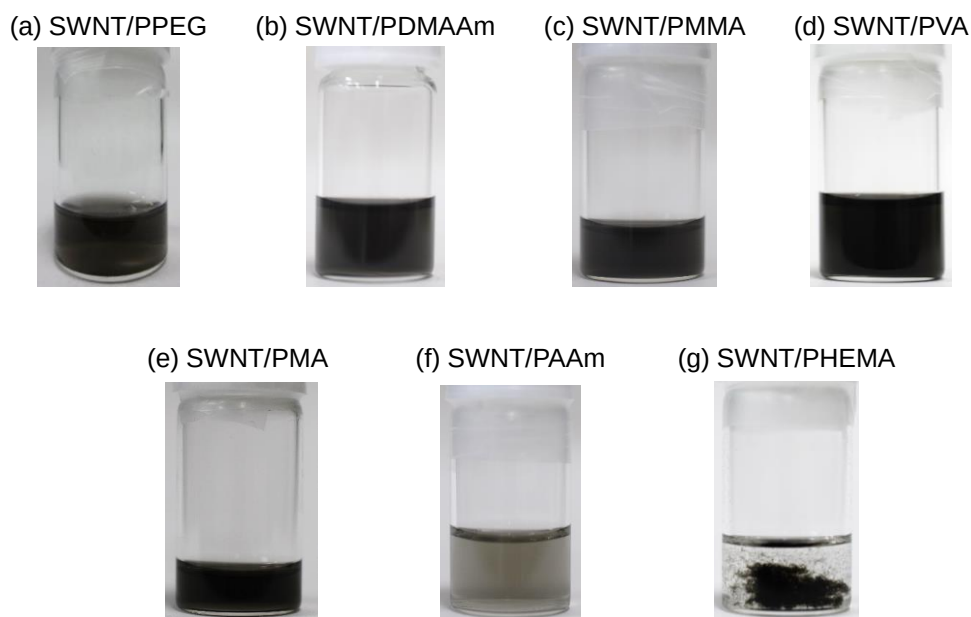


Figure 3-3. (a-f) Photographs of the polymer-SWNT hybrids in aqueous solutions. (g) Photograph of SWNT/PHEMA in an aqueous solution before the filtration with cotton as a filter.

Figure 3-4 に、合成した各架橋高分子被覆 SWNT 溶液の吸収スペクトル測定の結果をまとめて示す。ここで、合成に用いた SWNT/SDS 可溶化溶液の吸収スペクトル測定の結果も **Figure 3-4 (a)** に併せて示している。SWNT/PHEMA は測定自体が困難であったため、**Figure 3-4** には示していない。

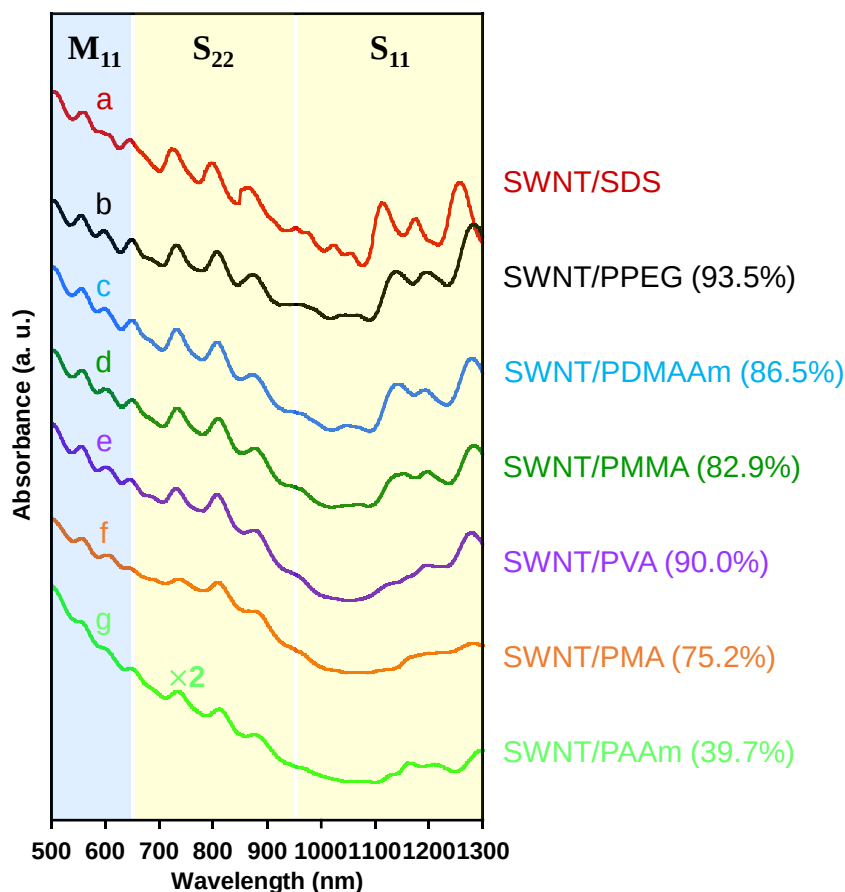
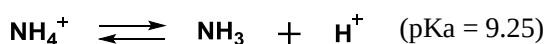
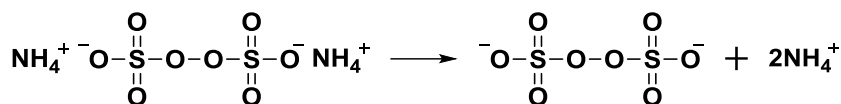


Figure 3-4. (a) Absorption spectrum of the SWNTs solubilized in SDS aqueous solution. (b-g) Absorption spectra of the polymer-SWNT hybrids in aqueous solutions. Yields of the polymer-SWNT hybrids are also shown in parenthesis.

まず、SWNT/PPEG、SWNT/PDMAAm、SWNT/PMMA では SWNT/SDS 可溶化溶液と同様に S_{11} 、 S_{22} 、 M_{11} 領域に SWNT 由来のシャープなピークが観察された。したがって、これらの複合体の溶液中で SWNT は孤立分散を維持していると考えられる。一方、SWNT/PVA、SWNT/PMA、SWNT/PAAm では S_{22} 、 M_{11} 領域に SWNT 由来のシャープなピークが見られたものの、 S_{11} 領域ではブロード化したピークが観察された。この原因として、①溶液中での SWNT 小凝集体の形成⁹、または②SWNT のプロトン化による一時的な吸収のブリーチング、あるいは①と②が同時に起こっていることが考えられる。②について以下に説明する。

Strano らは、SWNT/SDS 可溶化溶液の pH が 6~2.5 の時、プロトンが SWNT 表面と可逆的に反応し、吸収のブリーチング、PL の消光が起こることを報告している¹⁰。また、野口らは二重らせん DNA で可溶化した SWNT 溶液においても、溶液中の pH を 6.4 から 5.8 に変化させると吸収のブリーチングおよび PL の消光が起こることを報告している¹¹ (Figure 3-5)。よって、今回合成した SWNT/PVA、SWNT/PMA、SWNT/PAAm においても、上記の報告と同様に SWNT のプロトン化による吸収のブリーチングが起こっている可能性がある。本研究では、反応開始剤として APS 水溶液を使用しており、以下に示すように APS が分解し、アンモニウムイオンからプロトンが生成されると思われる。実際に、架橋高分子被覆 SWNT の合成に用いた APS の濃度 (1.03×10^{-3} mol/L) を基に pH を計算すると反応溶液の pH は約 5.9 となる。



合成後は、反応溶液に対して純水でフィルター濾過・再分散し、未反応モノマーと SDS の除去を行っているが、このときに SDS のカウンターカチオンである Na^+ が NH_4^+ と置換した状態で除去されると溶液の pH は高くなる (中性に近くなる)。その結果、SWNT/PPEG、SWNT/PDMAAm、SWNT/PMMA では SWNT の吸収は回復したと言える。一方、SWNT/PVA、SWNT/PMA、SWNT/PAAm では何らかの理由で NH_4^+ が SWNT を被覆した架橋高分子層に残留し、SWNT 表面で局所的に pH が低くなり SWNT の吸収が回復していない可能性がある。以上より、SWNT/PVA、SWNT/PMA、SWNT/PAAm では、溶液中で SWNT の一部が小凝集体を形成している可能性と、一時的な吸収のブリーチングが起こっている可能性の両方が考えられた。

次に、各架橋高分子被覆 SWNT 溶液において SWNT の収率を求めた。結果は Figure 3-4 のサンプル名の横のカッコ内に示している。ここで言う収率は、各架橋高分子被覆 SWNT 溶液の 500 nm における吸光度を、合成に用いた SWNT/SDS 可溶化溶液の 500 nm における吸光度で割って算出しており、合成に用いた SWNT のうちどの程度の SWNT が合成・精製

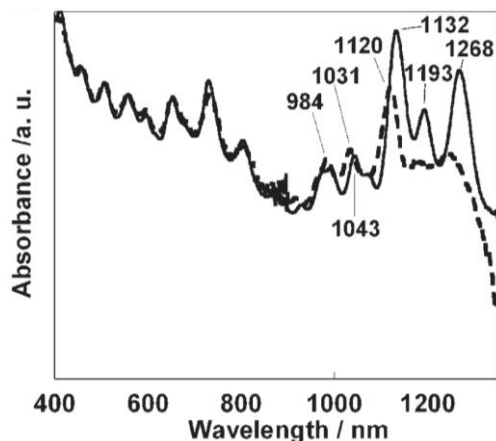


Figure 3-5. Vis/NIR absorption spectra of HiPco-SWNTs dissolved in phosphate buffer solutions of dsDNA at pH 5.8 (dotted line) and 6.4 (solid line). Data is taken from ref. 11.

操作後に回収できたかを示している。各架橋高分子被覆 SWNT 溶液の吸収スペクトルの生データは **Figure 3-6** に、500 nm における吸光度 (Abs@500 nm) の値をまとめたものは **Table 3-1** に示す。例えば SWNT/PAAm の場合、SWNT/PAAm の Abs@500 nm = 0.445、SWNT/SDS 可溶化溶液の Abs@500 nm = 1.12 より、収率は $0.445/1.12 \times 100 = 39.7\%$ となる。この計算方法で収率を求めた結果、SWNT/PPEG、SWNT/PDMAAm、SWNT/PMMA、SWNT/PVA、SWNT/PMA の 5 つでは 75%を超える高い収率で複合体を作製出来ていることがわかった。一方、SWNT/PAAm の収率は 39.7%と低かった。これは、SDS 除去後に大量の凝集物が生じたことが原因である。また、PMMA、PVA、PMA は水への溶解性が低いにもかかわらず、SWNT/PMMA、SWNT/PVA、SWNT/PMA の収率は高かった。これは、重合開始剤として用いた APS の分解切片である硫酸エステルイオン-OSO₃が粒子表面に導入され、静電反発作用により安定化されている¹²⁻¹⁴と考えられる。なお、SWNT/PHEMA に関しては吸収スペクトル測定自体が困難であるため、収率は求めている。

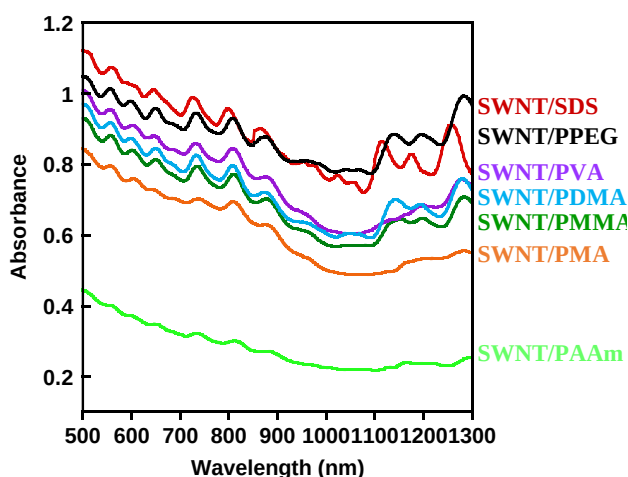


Figure 3-6. Absorption spectra of the polymer-SWNT hybrids in aqueous solutions. The optical cell length is 1 cm. These data are taken from ref. 8.

Table 3-1. Absorbance@500 nm of the polymer-SWNT hybrids in aqueous solutions.

Sample	Abs@500 nm
SWNT/0.2wt%SDS	1.12
SWNT/PPEG	1.05
SWNT/PDMAAm	0.971
SWNT/PMMA	0.930
SWNT/PVA	1.01
SWNT/PMA	0.845
SWNT/PAAm	0.445
SWNT/PHEMA	-

さらに、SWNT/PHEMA 以外の各架橋高分子被覆 SWNT に対して DLS による粒径分布測定を行った結果を **Figure 3-7** に示す。また、比較として合成に用いた SWNT/SDS 可溶化溶液の結果 (赤線) も併せて示している。SWNT/PPEG、SWNT/PDMAAm、SWNT/PMMA、SWNT/PVA、SWNT/PMA では 30 nm と 200 nm にピークを有する多分散の粒径分布が得られ、SWNT/SDS 可溶化溶液で得られた粒径分布とほぼ同じ分布であった。この結果は、これら 5 つの架橋高分子被覆 SWNT が孤立分散に近い状態にあることを示唆している。一方で、SWNT/PAAm においては 70 nm と 500 nm にピークを有する多分散の粒径分布が得られ、SWNT の凝集体の形成が示唆された。SWNT/PAAm の収率が低かったことから、SWNT 表面は PAAm で十分に被覆されていないと考えられる。

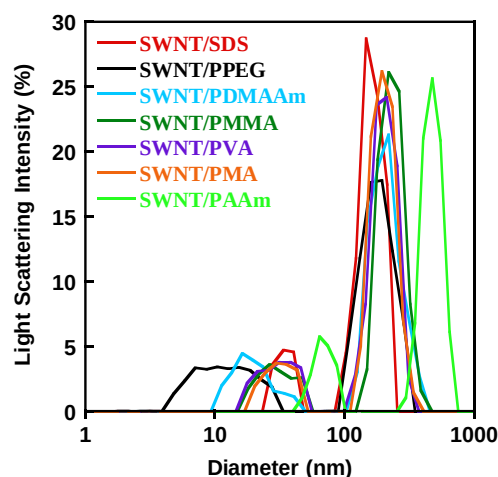


Figure 3-7. DLS profiles of the polymer-SWNT hybrids dispersed in aqueous solutions. These data are taken from ref. 8.

続いて、SWNT/PHEMA 以外の各架橋高分子被覆 SWNT に対して AFM 測定を行った結果を **Figure 3-8** に示す。なお、AFM 測定は、各架橋高分子被覆 SWNT 溶液を精製のために 600000 *g* で 30 分間遠心分離し、上澄み液を分取後、残った沈殿物を水で再分散させたものに対して行っている。**Figure 3-8** より、全ての複合体において、棒状粒子が多数観察された。これら棒状粒子の平均長さは(a) SWNT/PPEG は 173.6 nm (N = 55)、(b) SWNT/PDMAAm は 268.4 nm (N = 50)、(c) SWNT/PMMA は 264.8 nm (N = 76)、(d) SWNT/PVA は 282.2 nm (N = 59)、(e) SWNT/PMA は 265.2 nm (N = 90)、(f) SWNT/PAAm は 240.8 nm (N = 70) であった。また、それぞれの平均高さは、(a) SWNT/PPEG は 1.09 nm、(b) SWNT/PDMAAm は 1.43 nm、(c) SWNT/PMMA は 2.86 nm、(d) SWNT/PVA は 2.38 nm、(e) SWNT/PMA は 4.96 nm、(f) SWNT/PAAm は 2.28 nm (それぞれ N=30) と求められた。本研究で用いている HiPco-SWNT の直径が~1 nmであることを考えると、SWNT は極めて薄い架橋高分子層で被覆されていると考えられる。今回合成したビニルポリマー (PPEG、PDMAAm、PMMA、PVA、PMA、PAAm) は全て芳香環を有していないため、SWNT との相互作用は、SWNT を孤立分散できるほど強くない¹⁵。したがって、各複合体の分散は、各ビニルポリマーの「架橋」により達成されていると言える。

また、**Figure 3-8 (f)**では棒状粒子と共に、マイクロサイズの巨大な物体 (**Figure 3-8 (f)**内の矢印で示したもの) が観察された。

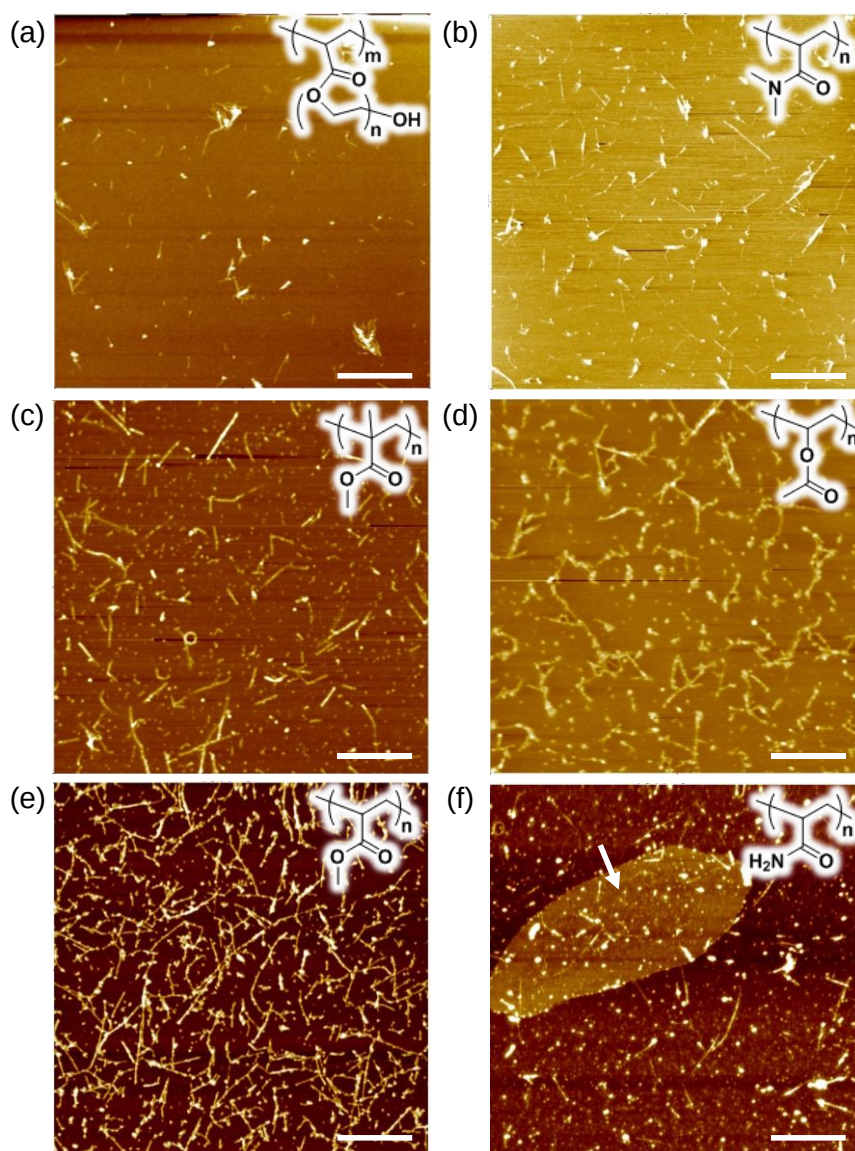


Figure 3-8. AFM images of (a) SWNT/PPEG, (b) SWNT/PDMAAm, (c) SWNT/PMMA, (d) SWNT/PVA, (e) SWNT/PMA and (f) SWNT/PAAm cast on mica substrates. Scale bars, 1 μm. These data are taken from ref. 8.

続いて、SWNT/PHEMA 以外の各架橋高分子被覆 SWNT に対してラマンスペクトル測定を行った結果を **Figure 3-9** に示す。また、それぞれの I_D/I_G を求めた結果を **Table 3-2** に示す。架橋高分子と SWNT 表面が反応している割合が高い (I_D/I_G が大きい) ほど、複合体の収率が高くなるのではないかと考えたが、 I_D/I_G の値と複合体の収率に関係性は見られなかった。各架橋高分子被覆 SWNT の I_D/I_G は、化学修飾で合成された一般的な SWNT/高分子複合体¹⁶⁻¹⁸ の I_D/I_G よりもずっと小さく (**Table 3-2**)、「ミセル内部空間を重合場として利用

した架橋高分子合成」により、SWNT 表面にほとんど欠陥を導入せず、かつ高い分散安定性をもつ SWNT/高分子複合体の合成を、SWNT と強い相互作用を持たない高分子を用いて達成できたことがわかった。

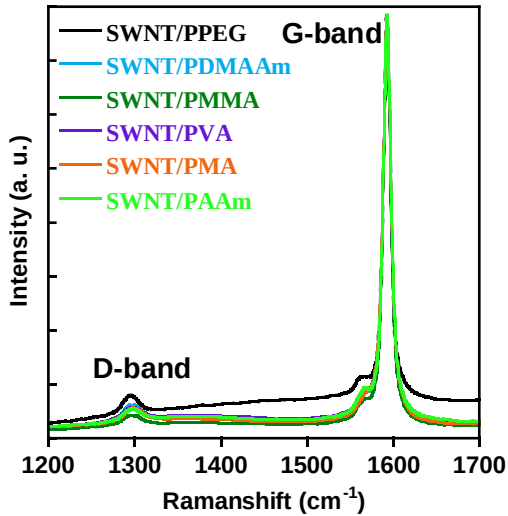


Figure 3-9. Raman spectra of the polymer-SWNT hybrids in aqueous solutions.

Table 3-2. Comparison of I_D/I_G of the polymer-SWNT hybrids.

Sample	I_D/I_G	Ref.
SWNT/PPEG	0.073	
SWNT/PDMAAm	0.060	
SWNT/PMMA	0.040	This work
SWNT/PVA	0.049	
SWNT/PMA	0.052	
SWNT/PAAm	0.043	
SWNT/PMMA (グラフト化)	0.33	[16]
SWNT/Polystyrene (グラフト化)	~ 0.3	[17], [18]

以上の結果より、モノマーとして PEG-MA、DMAAm、MMA、VA、MA を用いた場合には高収率（75%以上）で架橋高分子被覆 SWNT を合成できた。一方、AAm を用いた場合には収率（40%以下）が低く、さらに HEMA を用いた場合には架橋高分子被覆 SWNT の合成自体困難であることがわかった。PPEG、PDMAAm、PMMA、PVA、PMA を用いて、SWNT 表面にほとんど欠陥導入せず、かつ高い被覆安定性を有する SWNT 複合体を作製した報告はこれまでにない。よって、本研究で開発した「ミセル内部空間を重合場として利用した架橋高分子合成法」により、様々な新規 SWNT/高分子複合体を合成可能であると示すことが出来た。

3-3-2. 合成における必要条件の探索（モノマー添加後の吸収スペクトル測定）

3-3-1 で示したように、モノマーとして PEG-MA、DMAAm、MMA、VA、MA を用いた場合には高収率（75%以上）で架橋高分子被覆 SWNT を合成できた一方で、AAm、HEMA を用いた場合にはその収率は低く（40%以下）、合成は困難であることがわかった。続いて本節では、どのような合成条件の時に架橋高分子被覆 SWNT の合成が可能であるか調べることを目的とする。まず、架橋高分子被覆 SWNT が合成されるためには、「SWNT を分散したミセル内部空間へとモノマーが侵入することが必要である」と仮説を立てた。そこで、3-3-1 で用いた 7 つのモノマーを添加後の SWNT/SDS 可溶化溶液の吸収スペクトル測定を行い、どのモノマーがミセル内部空間に侵入しているかを調べることにした。SWNT は、分散剤の置換などその周囲の誘電率の変化に伴い吸収ピークのシフトが起こることが知られている¹⁹。また、SWNT を分散したミセル内部空間へと有機溶媒が侵入すると、誘電率の違いにより異なるピーク波長を示す²⁰。さらには、光異性化分子が侵入すると発光ピークがシフトし、ミセル内部での構造変化に伴いさらにピークシフトが起こることも近年報告されている²¹。今回は、SWNT のこのような光学特性を利用し、SWNT を分散したミセル内部にモノマーが侵入したかどうかを吸収ピークのシフトから調べた。

Figure 3-10 に、各モノマー添加前後の SWNT/0.2 wt% SDS 可溶化溶液の吸収スペクトル測定の結果を示す。モノマー添加前の吸収スペクトル（赤線）と比較して、PEG-MA、DMAAm、MMA、HEMA を添加後では長波長側にピークシフトが見られた。例えば 1110 nm 付近のピークを見ると、モノマー添加前の吸収ピーク（1114 nm）と比較して PEG-MA 添加後は約 19 nm、DMAAm、MMA 添加後は約 6 nm、HEMA 添加後は約 2 nm のピークシフトが観察された。よって、これらのモノマーは SWNT を分散したミセル内部空間に侵入していると考えられた。一方で、VA、MA、AAm を添加後のシフト量は 1 nm 以下であり、ミセル内部空間へは侵入できていないと判断した。以上の結果より、PEG-MA、DMAAm、MMA、AAm は、モノマーのミセル内部への侵入のしやすさと合成した架橋高分子被覆 SWNT の収率との間に良い相関が得られた（Table 3-3、橙色で示した部分）。一方、HEMA はミセル内部空間へと侵入しやすいと思われたが、3-3-1 で述べたように SWNT/PHEMA の収率は非常に低かった。また、VA、MA はミセル内部へ侵入しにくいと思われたが SWNT/PVA、SWNT/PMA の収率は高く（それぞれ 90.0%、75.2%）、これらの結果も予想とあわない（Table 3-3、青色で示した部分）。従って、SWNT を分散したミセル内部空間へのモノマーの侵入のしやすさは、架橋高分子被覆 SWNT の収率の高さとは必ずしも一致しておらず、新たな仮説を考える必要があるとわかった。

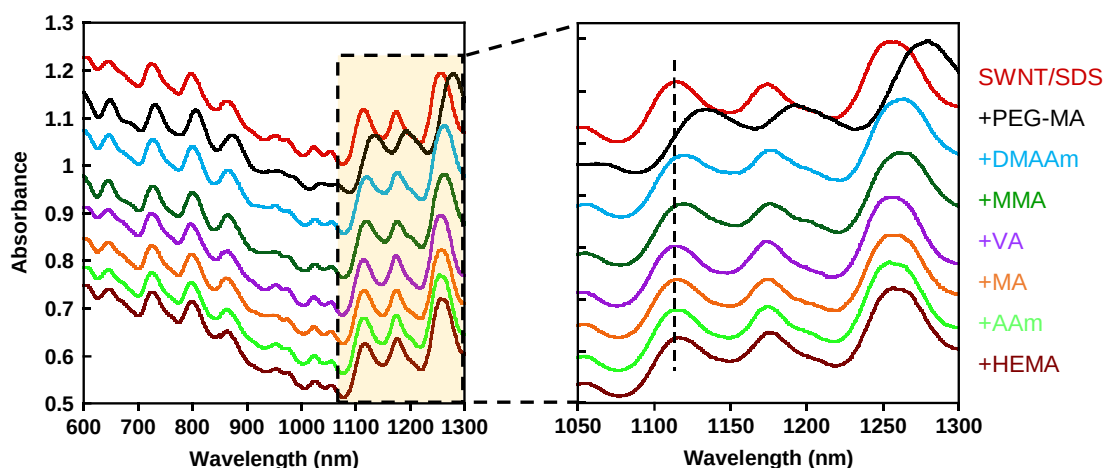


Figure 3-10. Absorption spectra of SWNTs dispersed in 0.2 wt% SDS aqueous solutions before and after the addition of specified monomers. The optical cell length is 1 mm.

Table 3-3. Absorption peaks (amount of shift in parenthesis) of SWNTs dispersed in 0.2wt% SDS aqueous solutions after the addition of specified monomers and the obtained yields of the SWNT hybrids synthesized using the monomers.

Added monomer	Absorption peak (shift)	Yield of SWNT hybrids
+PEG-MA	1133.1 nm (+19.1 nm)	93.5%
+DMAAm	1119.6 nm (+5.6 nm)	86.5%
+MMA	1119.8 nm (+5.8 nm)	82.9%
+VA	1113.4 nm (−0.6 nm)	90.0%
+MA	1114.9 nm (+0.9 nm)	75.2%
+AAm	1114 nm (± 0 nm)	39.7%
+HEMA	1115.7 nm (+1.7 nm)	~0%

3-3-3. 合成における必要条件の探索（ミセル内での粒子形成の可否を観察）

続いて、新たな仮説を立てた。**Figure 3-8 (a-e)**をよく観察すると、棒状粒子と共にナノ粒子が多数存在している。一方で、前述したように**Figure 3-8 (f)** (SWNT/PAAm) ではマイクロサイズの巨大な物体が混在していることがわかっている。ここで、観察されたナノ粒子は界面活性剤ミセル内部で形成された粒子、マイクロサイズの物体はミセル外のパルク溶液中で形成された架橋 PAAm ではないかと考えた。もしこの予想が当たっているならば、モノマーとして PEG-MA、DMAAm、MMA、VA、MA を用いた場合には**Figure 3-11 (Route A)**のように SWNT の存在の有無にかかわらずミセル内部で重合が進み架橋高分子被覆 SWNT とナノ粒子がともに形成され、AAm を用いた場合には**Figure 3-11 (Route B)**のようにミセル内部だけでなくミセル外部でも重合が進み、SWNT の凝集物が大量に生じた可能性が考えられる。以上より、ミセル内部で選択的に重合が進むような合成条件では架橋高分子被覆 SWNT を高収率で合成でき、ミセル外部でも重合が進む場合は架橋高分子被覆 SWNT の合成は困難になるという仮説を立てた。

もし上記の仮説が正しいのならば、架橋高分子被覆 SWNT が得られなかった HEMA を用いた場合には、**Figure 3-11 (Route B)**のようにマイクロサイズの物体が形成されていることになる。そこで AFM 測定により評価することにした。また、PEG-MA、DMAAm を用いた場合にナノ粒子が本当に形成されているか調べるため、STEM により評価した。MMA²²、VA^{23, 24}、MA²⁵ を用いた場合には、ミセル内での粒子形成が可能であることがすでに報告されているため、今回は測定を行っていない。

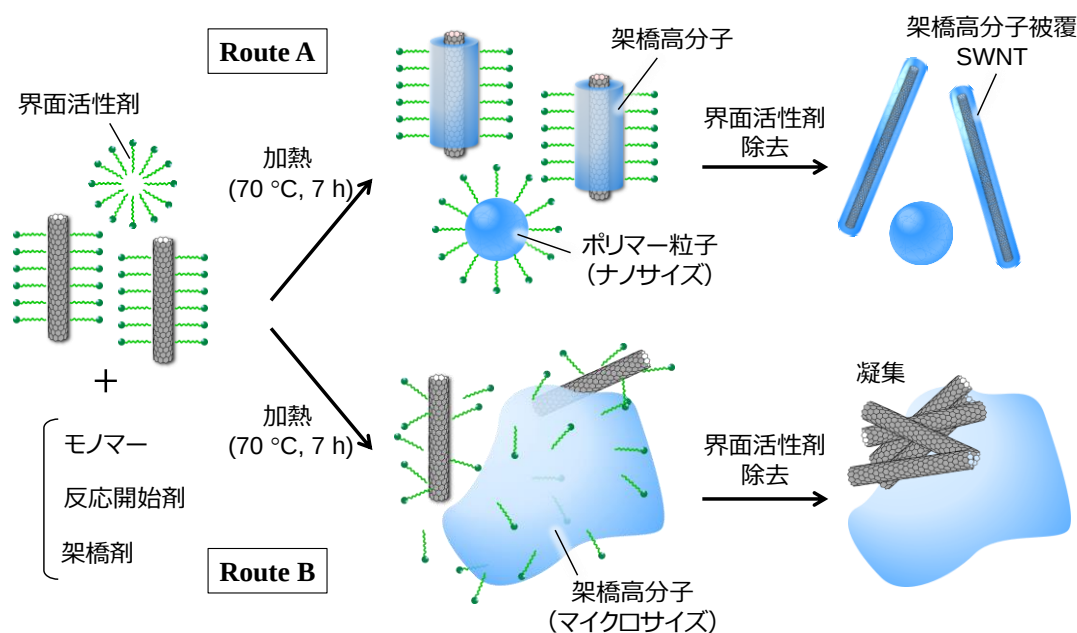


Figure 3-11. Schematic illustration for the preparation of the polymer-SWNT hybrids based on Route A (top) and Route B (bottom).

Figure 3-12 に SWNT/PHEMA の上澄み液の AFM 測定の結果を示す。ナノ粒子は観察されず、マイクロサイズを超える粒子や高分子膜のような物体のみが観察された。これらは、ミセル外部で形成された架橋 PHEMA であると考えられる。実際に、本研究で用いた界面活性剤 SDS と反応開始剤 APS の組み合わせでは、ミセル内部での粒子形成は困難であることが報告されており²⁶、一致する結果が得られた。以上より、仮説を支持する結果が得られた。

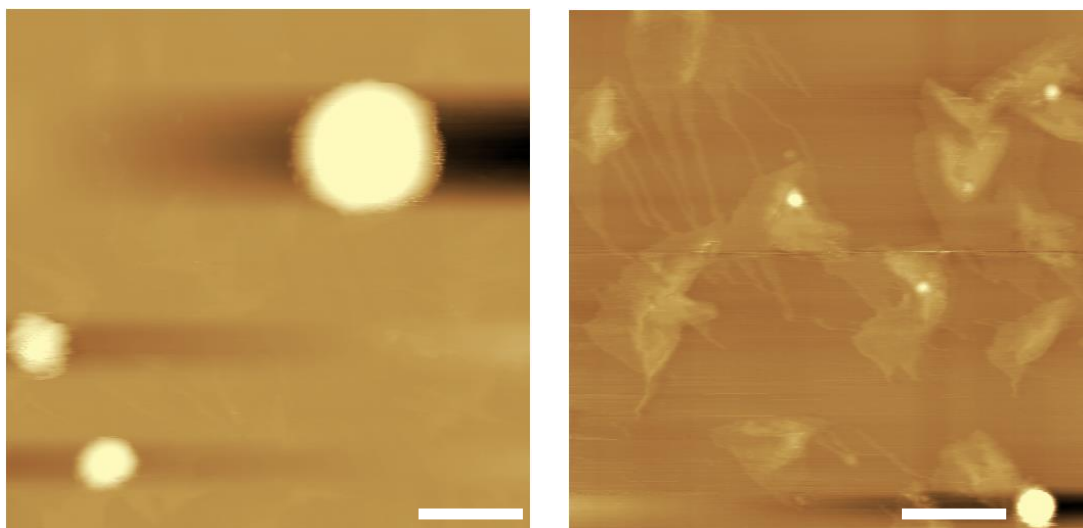


Figure 3-12. AFM images of the supernatant from SWNT/PHEMA cast on mica substrates. Scale bars, 1 μm . These data are taken from ref. 8.

続いて、SWNT/PPEG、SWNT/PDMAAm の上澄み液に対して STEM 測定を行った結果を **Figure 3-13 (a), (c)**に、DLS による粒径分布測定を行った結果を **Figure 3-13 (b), (d)**に示す。まず STEM 像からは共に直径 50 nm 前後の球状粒子が多数観察され、これらはそれぞれ PPEG、PDMAAm から成るナノ粒子であると思われる。また、DLS による粒径分布測定の結果、10～50 nm にかけて分布が得られ、ナノ粒子の存在を示す結果が得られた。したがって、これらのモノマーは界面活性剤水溶液中でナノ粒子の形成が可能であるとわかった。これらナノ粒子は、ミセル内部空間で選択的に重合が進んだ結果得られたと思われる。したがって、こちらも仮説を支持する結果が得られた。

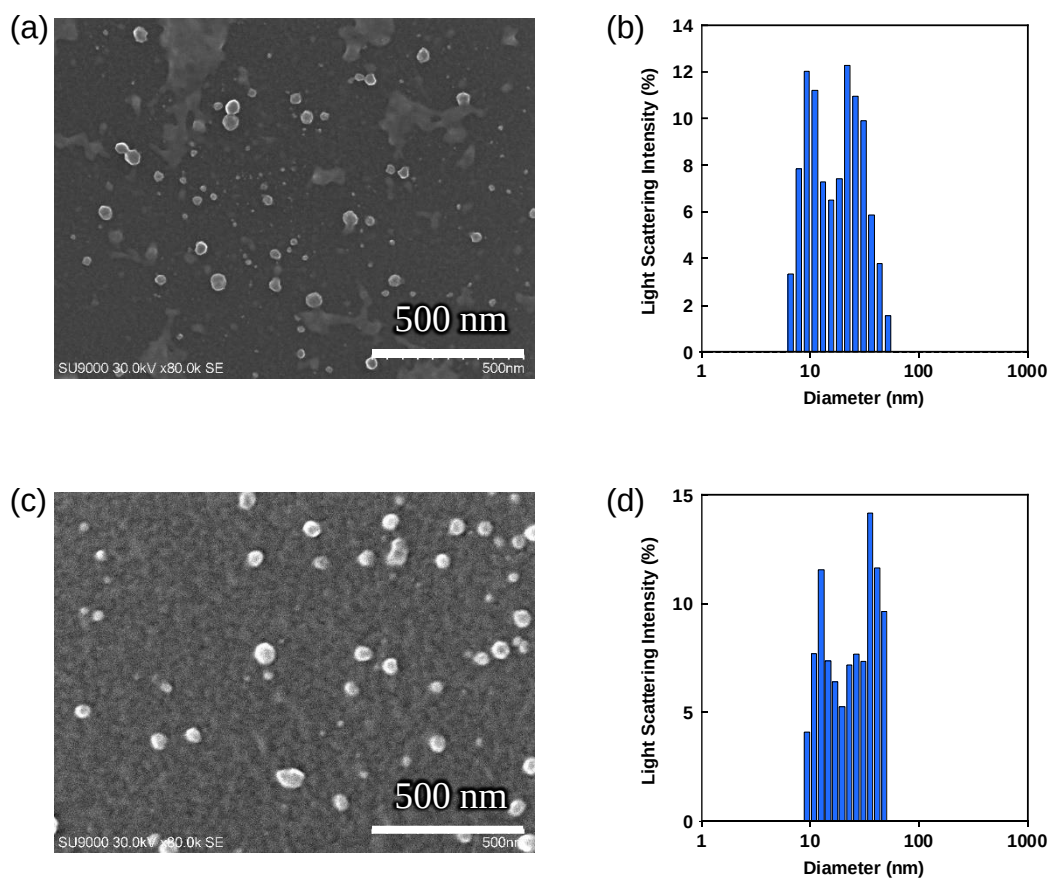


Figure 3-13. (a, c) STEM images and (b, d) DLS histograms of the supernatants from (a, b) SWNT/PPEG and (c, d) SWNT/PDMAAm.

以上より、ミセル内部で選択的に重合が進むような条件の場合には架橋高分子被覆 SWNT を高収率で合成でき、ミセル外部でも重合が進むようなモノマー、反応開始剤などの選択を行った場合には、架橋高分子被覆 SWNT の合成は困難になるということがわかった。

3-4. まとめ

7つのモノマーを用いて「架橋高分子被覆 SWNT」の合成を行い、モノマーとして PEG-MA、DMAAm、MMA、VA、MA を用いた場合には高収率（75%以上）で架橋高分子被覆 SWNT を合成でき、様々な新規 SWNT/高分子複合体を合成可能であると示すことが出来た。一方、AAm を用いた場合には収率（40%以下）が低く、HEMA を用いた場合には架橋高分子被覆 SWNT の合成自体困難であることがわかった。さらに、各複合体の溶液に対して AFM、STEM 測定を行ったところ、高収率で架橋高分子被覆 SWNT が得られた場合にはナノ粒子が共存しており、低収率で架橋高分子被覆 SWNT が得られた場合にはマイクロサイズの物体が共存していることが明らかとなった。ナノ粒子はミセル内部空間で、マイクロサイズの物体はミセル外部で重合が進んだ結果得られたと考えられる。従って、「ミセル内部で選択的に重合が進む合成条件の選択」が、架橋高分子被覆 SWNT 合成のための必要条件であるということがわかった。

参考文献

1. R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. De Heer, *Science* **2002**, 297, 787.
2. T. W. Chou, L. Gao, E. T. Thostenson, Z. Zhang, J. H. Byun, *Compos. Sci. Technol.* **2010**, 70, 1.
3. M. F. De Volder, S. H. Tawfick, R. H. Baughman, A. J. Hart, *Science* **2013**, 339, 535.
4. C. S. Zhang, Q. Q. Ni, S. Y. Fu, K. Kurashiki, *Compos. Sci. Technol.* **2007**, 67, 2973.
5. D. Kim, Y. Kim, K. Choi, J. C. Grunlan, C. Yu, *ACS Nano* **2010**, 4, 513.
6. M. Bottini, N. Rosato, N. Bottini, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 3381.
7. D. Wang, L. Chen, *Nano Lett.* **2007**, 7, 1480.
8. Y. Tsutsumi, T. Fujigaya, N. Nakashima, *Chem. Lett.* **2016**, 10.1246/cl.151086.
9. M. J. O'Connell, S. M. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman, R. E. Smalley, *Science* **2002**, 297, 593.
10. M. S. Strano, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. J. O'Connell, E. H. Haroz, J. Hubbard, M. Miller, K. Rialon, C. Kittrell, S. Ramesh, R. H. Hauge, R. E. Smalley, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 6979.
11. Y. Noguchi, T. Fujigaya, Y. Niidome, N. Nakashima, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 5966.
12. H. Ono, H. Saeki, *Br. Polym. J.* **1975**, 7, 21.
13. H. Ono, H. Saeki, *Colloid Polym. Sci.* **1975**, 253, 744.
14. A. S. Dunn, L. C. H. Chong, *Br. Polym. J.* **1970**, 2, 49.
15. T. Fujigaya, N. Nakashima, *Polym. J.* **2008**, 40, 577.
16. F. Liang, J. M. Beach, K. Kobashi, A. K. Sadana, Y. I. Vega-Cantu, J. M. Tour, W. E. Billups, *Chem. Mater.* **2006**, 18, 4764.
17. H. Li, F. Cheng, A. M. Duft, A. Adronov, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14518.
18. S. Qin, D. Qin, W. T. Ford, D. E. Resasco, J. E. Herrera, *Macromolecules* **2004**, 37, 752.
19. Y. Kato, A. Inoue, Y. Niidome, N. Nakashima, *Sci. Rep.* **2012**, 2, article number 733.
20. R. K. Wang, W. C. Chen, D. K. Campos, K. J. Ziegler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16330.
21. S. K. Kreft, M. Å. Petersen, M. B. Nielsen, S. Reich, A. Setaro, *J. Phys. Chem. C* **2015**, 119, 15731.
22. G. He, Q. Pan, G. L. Rempel, *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, 24, 585.
23. S. Okamura, T. Motoyama, *J. Polym. Sci.* **1962**, 58, 221.
24. M. Nomura, M. Harada, K. Nakagawara, W. Eguchi, S. Nagata, *J. Chem. Eng. Jpn.* **1971**, 4, 160.
25. H. Gerrens, *J. Polym. Sci. C* **1969**, 27, 77.
26. A. M. Imroz Ali, K. Tauer, M. Sedlak, *Polymer* **2005**, 46, 1017.

4 章

架橋高分子被覆 SWNT の短尺化

4-1. 序

多くの CNT は、絡まった状態を形成することでマイクロスケールの長さを有し、多分散状態で合成される。しかし、CNT の生体応用を考えた場合、100~200 nm の長さを持つ CNT の利用が望ましい。これは、CNT の生体応用において、CNT のサイズ（長さ）が、その「生体毒性」と「細胞取り込み」に非常に大きな影響を与えるためである。まず、「生体毒性」に関して述べる。CNT が分散している場合は、一般的に CNT の長さが短いほど生体毒性は低くなる^{1,4}ことが知られている。例えば、Poland らは MWNT（長さ 10 - 50 μm 、直径 80-160 nm）をマウスに大量に腹腔投与すると悪性中皮腫のような症状が観察されたと報告している⁵が、Poland らが用いたものと同じ MWNT を化学修飾で切断し、短く（長さ 2 - 4 μm ）してから投与した場合は、同じ投与量でも炎症などの異常は観察されないことが近年報告されている¹。また、Muller らの報告では、短い MWNT（<1 μm ）を腹腔投与した場合は、2 年もの間、中皮腫の発生は認められていない²。さらに SWNT においては、同じ長さでも MWNT よりも毒性が低いことが知られており³、より生体応用に適している。特に、300 nm 以下の短い SWNT は、細網内皮系（RES）から逃れ、尿と一緒に体外に排出される⁴。

しかしながら「細胞取り込み」も考慮した場合、短ければ短いほど良いというわけではなく、100~200 nm 程度の長さを持つ SWNT ががん治療薬としての利用に最適であると報告されている⁶。これは、SWNT の長さにより細胞への取り込まれやすさ、および細胞に取り込まれた後の局在位置が異なるためである⁶。100~200 nm の SWNT は細胞質に存在する（**Figure 4-1 (c)**）のに対し、更に短い SWNT（50~100 nm）は細胞核にまで運ばれ（**Figure 4-1 (d)**）、DNA の損傷を引き起こす可能性がある。また、50~100 nm まで短くなると、通常細胞による非選択的な取り込みも多く起こるようになり、がん細胞選択的な取り込みを目指すがん治療薬としては不利となる。

上記 2 つの理由に加え、1 章で述べた EPR 効果（ナノ粒子（10~200 nm 位）が本質的に固形がん部位に選択的に蓄積しやすい性質）の利用も考えた場合、SWNT をがん治療へと利用するには 100~200 nm の範囲で、ある程度長さの揃った SWNT が必要となる。

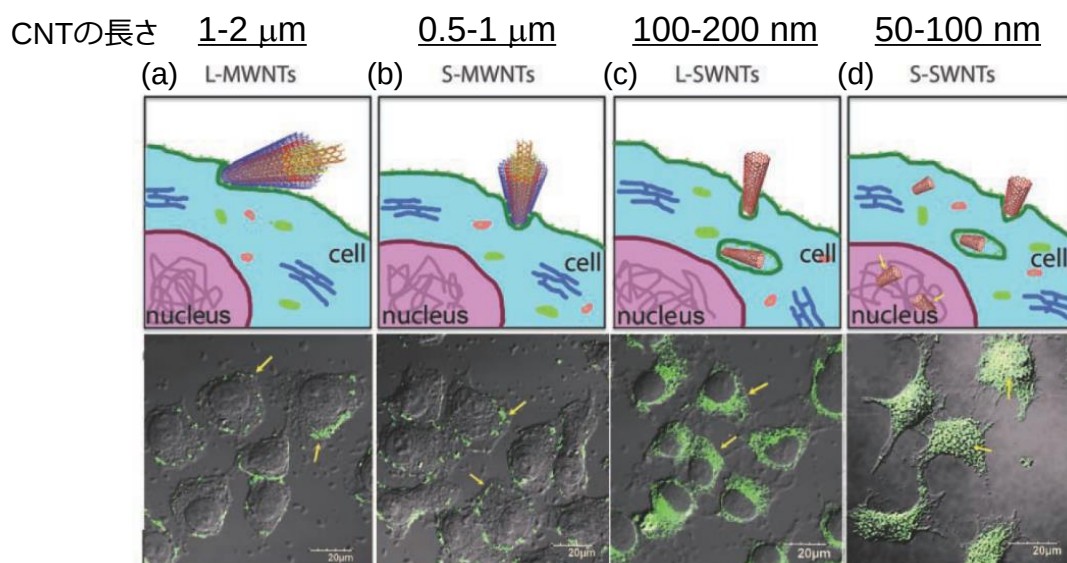


Figure 4-1. Illustrations with the corresponding confocal images of Hep G2 cells incubated with different size CNTs; arrows indicate the position of the CNTs. The figure is taken from ref. 6.

短い SWNT を得るための方法として、最も広く使われているのは酸処理^{7,8}やボールミル処理^{9,10}により OH 基や COOH 基を CNT 表面に導入する^{11,12}ことで、SWNT を切断する方法である。しかし、このような官能基の導入により生じた欠陥は、近赤外域における光学特性など SWNT の特異な性質を減少させてしまう。したがって、SWNT 表面構造を破壊せず、かつ短い SWNT を得る方法が求められている。現在、この要望を満たす方法として、サイズ排除クロマトグラフィー¹³⁻¹⁶、密度勾配遠心分離^{17,18}、遠心分離^{19,20}に基づいた長さ分離法がいくつか報告されているが、合成された SWNT のうち、長さの短いものを選択的に分離しているため、その収率はとても低い（～50%）。さらに、操作が非常に煩雑であり、長時間を要する（数時間～十数時間）という点も問題である。

このような背景の中、我々は 2 章で合成した SWNT/PNIPAM に対して「超遠心分離」を行うと、切断が起こり、短い SWNT 複合体が得られることを偶然発見した²¹ (**Figure 4-2**)。本手法で行う操作は超遠心分離のみであり、非常に簡便かつ短時間で短い SWNT 複合体を得ることが可能であるため、非常に有望な手法と言える。本章では、SWNT/PNIPAM の超遠心分離による切断操作に対して、「超遠心分離の重力加速度・時間・回数」および「架橋 PNIPAM 層の架橋密度」が SWNT/PNIPAM の切断に対してどのような影響を与えるのかを調べ、短尺化された SWNT/PNIPAM の欠陥導入量、収率を他の手法と比較した。また、SWNT/PNIPAM-PEG に対して本手法が適用可能かどうかを調べた。

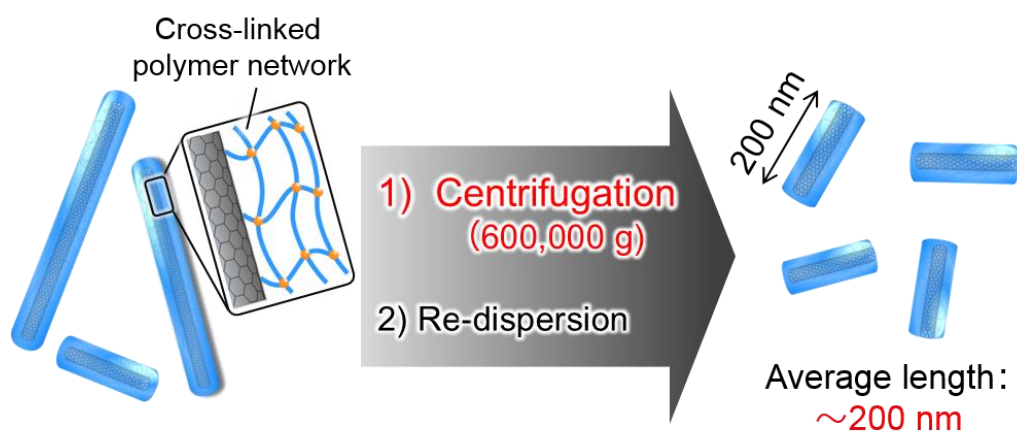


Figure 4-2. Schematic illustration for the shortening of SWNT/PNIPAM by the ultracentrifugation at 600000 *g*. The figure is taken from ref. 21.

4-2 実験

4-2-1. 使用試薬

- SWNT : As-produced HiPco SWNT (CNI)
- *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) (Wako)
- *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) (Wako)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (SIGMA-ALDRICH)
- Ammonium persulfate (APS) (Wako)
- SWNT/PNIPAM (2章で合成)
- SWNT/PNIPAM-PEG (2章で合成)
- 10×PBS Buffer (pH 7.4) (株式会社ニッポンジーン)

4-2-2. 使用機器

- バス型ソニケーター (Branson5510)
- 遠心機 : himac CS150GX (日立工機株式会社)
- 冷却循環装置 : CA-1112 (東京理化器械)
- オイルバス : NWB-120N (NISSIN)
- マグネティックスターラー : HERACLES (KPI)
- UV-vis-NIR 分光光度計 : V-670 (日本分光)
- 粒径測定システム : ELSZ-2 (測定温度 : 25 °C) (大塚電子)
- ラマン分光光度計 (励起波長 785 nm) (Kaiser)
- 原子間力顕微鏡 (AFM) : Agilent 5500 (東陽テクニカ)

4-2-3. 超遠心分離の「重力加速度」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響

SWNT/PNIPAM 溶液を遠心分離管 (1.5 mL) 2 本に 1 mL ずつ分取し、重力加速度を 120000 *g*、600000 *g* に設定し、それぞれ設定温度 25 °C で 30 分間遠心分離した。遠心分離後、上澄み液を分取し、残った沈殿物にはそれぞれ milliQ 水 1 mL を加え、超音波処理を行い再分散させた。得られた各再分散溶液に対して AFM 測定、DLS による粒径分布測定、ラマンスペクトル測定、吸収スペクトル測定を行い評価した。AFM 測定に関しては、各再分散溶液をマイカ基板上に 1 滴滴下し、1 分間スピンコート (slope 10 s, 3000 rpm 50 s) 後に、窒素ブローを 3 分間行い測定を行った。

4-2-4. 超遠心分離の「時間」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響

SWNT/PNIPAM 溶液から 2 mL ずつ分取し、600000 *g* で 1, 2, 5, 10 h 遠心分離を行った。遠心分離後、それぞれ上澄み液を除去し、沈殿物に対して milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングを行い、7 分間超音波照射を行って遠心分離時間の異なる再分散溶液を作製

した。まず、超遠心分離後の SWNT/PNIPAM のサイズを調べるため、各再分散溶液に対して DLS による粒径分布測定を行った。続いて、最も遠心分離時間の長い 10 h 遠心分離後の SWNT/PNIPAM に対してのみ AFM 測定を行うことにした。10 h 遠心分離後の SWNT/PNIPAM 再分散溶液をマイカ基板上に 1 滴滴下し、1 分間スピコート (slope 10 s, 3000 rpm 50 s) 後に、窒素ブローを 3 分間行い AFM 測定を行った。

4-2-5. 超遠心分離の「回数」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響

以下に示す手順に従って、遠心分離の回数の異なる SWNT/PNIPAM 溶液を作製した。また、操作の概略図を **Figure 4-3** に示す。

・**1 回遠心後の SWNT/PNIPAM の作製**: 2 章で合成した再分散前の SWNT/PNIPAM 溶液から 8 mL を分取し、8 本の遠心分離管 (1.5 mL) に 1 mL ずつに分け、600000 g で 30 分間遠心分離を行った。続いて上澄み液を除去し、沈殿物に対して milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングを行い、15 分間超音波照射を行って再分散溶液を得た。

・**2 回遠心後の SWNT/PNIPAM の作製**: 1 回遠心後の SWNT/PNIPAM から 6 mL を分取し、再度 600000 g で 30 分間遠心分離を行った。上澄み液を除去後、milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングし、5 分間超音波照射を行って再分散溶液を作製した。

・**3 回遠心後の SWNT/PNIPAM の作製**: 2 回遠心後の SWNT/PNIPAM から 4 mL を分取し、600000 g で 30 分間遠心分離を行い上澄み液を除去後、milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングし、5 分間超音波照射を行って再分散溶液を作製した。

・**4 回遠心後の SWNT/PNIPAM の作製**: 3 回遠心後の SWNT/PNIPAM から 2 mL を分取し、600000 g で 30 分間遠心分離を行い上澄み液を除去後、milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングし、5 分間超音波照射を行って再分散溶液を作製した。

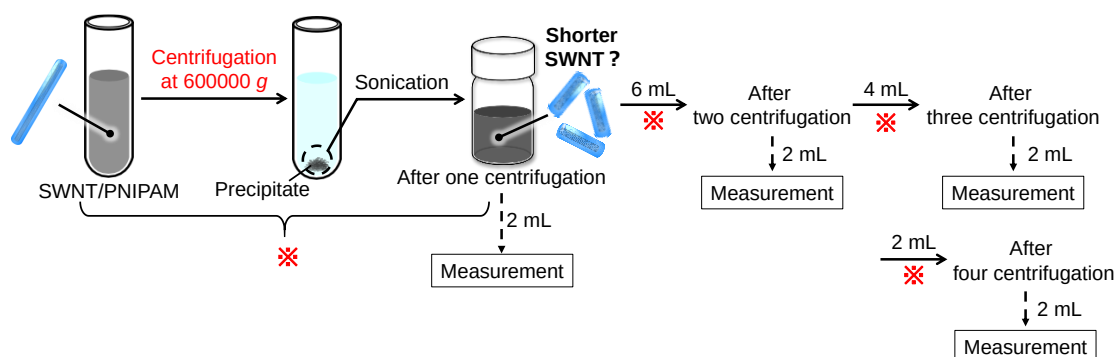


Figure 4-3. Schematic illustration showing the procedure of the preparation of SWNT/PNIPAM after one, two, three and four ultracentrifugations at 600000 g .

得られた遠心分離回数の異なる SWNT/PNIPAM 溶液に対して DLS による粒径分布測定を行い、さらにマイカ基板上に 1 滴滴下し、1 分間スピコート (slope 10 s, 3000 rpm 50 s) 後に、窒素ブローを 5 分間行い AFM 測定を行った。また、SWNT の表面状態を評価するため、ラマンスペクトル測定、吸収スペクトル測定を行った。

4-2-6. 異なる架橋密度を有する SWNT/PNIPAM に対して超遠心分離による切断

架橋剤の仕込み量を変えて、以下の手順で SWNT/PNIPAM (モノマー : 架橋剤の仕込み比 = 100 : 1) の合成を行う。合成したものは SWNT/PNIPAM (100) と表記する。

SDS 160 mg を水 79.84 mL に溶解し、0.2 wt% SDS 水溶液を作製した。このうち、分取した 10 mL に SWNT 1 mg を加えたスクリー管を 6 本準備し、それぞれバス型ソニケーターによって 1 時間超音波処理を行った。その後 8 本のアングルローター用の遠心分離管 (8 mL) に 7.2 mL ずつ分けて、設定温度 25 °C、60000 *g* で 1 時間遠心分離し、上澄み液を集め、この上澄み液をさらに 30 分間バス型ソニケーターで超音波処理した。こうして調整した上澄み液から 20 mL を、スターラーチップの入った三口フラスコに入れ、NIPAM 108.8 mg、BIS 1.49 mg を加えた (NIPAM : BIS = 100 : 1)。この混合溶液を撹拌しながら、室温で 1 時間窒素バブリングを行った。続いて、20 wt% APS 水溶液を 23 μ L 加え、窒素雰囲気下 70 °C で、7 時間反応を進めた。重合後の溶液は綿ろ過を行い、凝集物を取り除いた。この重合後の溶液から、SDS および未反応モノマーを除去するため撹拌型ウルトラホルダー (MWCO: 10000、ADVANTEC) に加え 7 回ろ過を行った。得られたろ過後の溶液を SWNT/PNIPAM (100) とする。合成した SWNT/PNIPAM (100) は、DLS による粒径分布測定によりサイズを評価し、吸収スペクトル測定により分散状態、ラマンスペクトル測定により欠陥存在量を評価した。

続いて、以下に示す手順に従い、SWNT/PNIPAM (100) に対して超遠心分離による切断を試み、遠心分離の回数の異なる SWNT/PNIPAM (100) を作製した。また、操作の手順は 4-2-5 節の **Figure 4-3** とほぼ同じである。

・ **1 回遠心後の SWNT/PNIPAM (100) の作製** : 合成した SWNT/PNIPAM (100) から 8 mL を分取し、8 本の遠心分離管 (1.5 mL) に 1 mL ずつに分け、600000 *g* で 30 分間遠心分離を行った。続いて上澄み液を除去し、沈殿物に対して milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングを行い、20 分間超音波照射を行った。一部が凝集体のままであったため綿ろ過で除去し再分散溶液を得た。

・ **2 回遠心後の SWNT/PNIPAM (100) の作製** : 1 回遠心後の SWNT/PNIPAM (100) 6 mL を再度 600000 *g* で 30 分間遠心分離を行った。上澄み液を除去後、milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングし、5 分間超音波照射を行って再分散溶液を作製した。

・ 3 回遠心後の SWNT/PNIPAM (100)の作製 : 2 回遠心後の SWNT/PNIPAM (100) 4 mL を 600000 *g* で 30 分間遠心分離を行い、上澄み液を除去後、milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングし、5 分間超音波照射を行って再分散溶液を作製した。

・ 4 回遠心後の SWNT/PNIPAM (100)の作製 : 3 回遠心後の SWNT/PNIPAM (100) 2 mL を 600000 *g* で 30 分間遠心分離を行い、上澄み液を除去後、milliQ 水をそれぞれ 950 μ L 加えてピペッティングし、5 分間超音波照射を行って再分散溶液を作製した。

得られた遠心分離回数の異なる SWNT/PNIPAM (100)に対して DLS による粒径分布測定を行い、さらにマイカ基板上に 1 滴滴下し、1 分間スピコート (slope 10 s, 3000 rpm 50 s) 後に、窒素ブローを 5 分間行い AFM 測定を行った。また、SWNT の表面状態の評価をラマンスペクトル測定によって、収率の評価を吸収スペクトル測定によって行った。

4-2-7. SWNT/PNIPAM-PEG に対して超遠心分離による切断の適用

SWNT/PNIPAM-PEG 溶液を遠心分離管 (1.5 mL) 8 本に 1 mL ずつ分取し、重力加速度を 600000 *g* に設定して設定温度 25 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離した。遠心分離後、上澄み液を分取し、残った沈殿物にはそれぞれ milliQ 水 1 mL を加え、超音波処理を 20 分間行い再分散させた。得られた再分散溶液に対し再度同条件で超遠心分離を行い、再分散溶液を得た。遠心前、1、2 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM-PEG に対して DLS による粒径測定を行い評価した。また、遠心分離・再分散後の SWNT/PNIPAM-PEG 溶液を一晩凍結乾燥し、同濃度となるように PBS buffer (pH 7.4)を加えて 30 分間超音波照射を行い再分散を試みた。

4-3. 結果・考察

4-3-1. 超遠心分離の「重力加速度」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響

Figure 4-4 に異なる重力加速度で超遠心分離・再分散を行って得られた再分散溶液の DLS による粒径分布測定の結果を示す。超遠心分離を行う前の SWNT/PNIPAM の粒径分布も併せて示している。120000 g で超遠心分離・再分散後では、SWNT/PNIPAM に由来する 200 nm 付近のピークに変化は見られなかった。一方、600000 g で超遠心分離・再分散後では、SWNT/PNIPAM に由来するピークは小さな分布を示す方へとシフトしていた。DLS のピークシフトと SWNT の長さ変化の間には良い相関があることが知られている^{19,22}ため、600000 g で超遠心分離後では SWNT/PNIPAM の長さが短くなっていると考えられた。

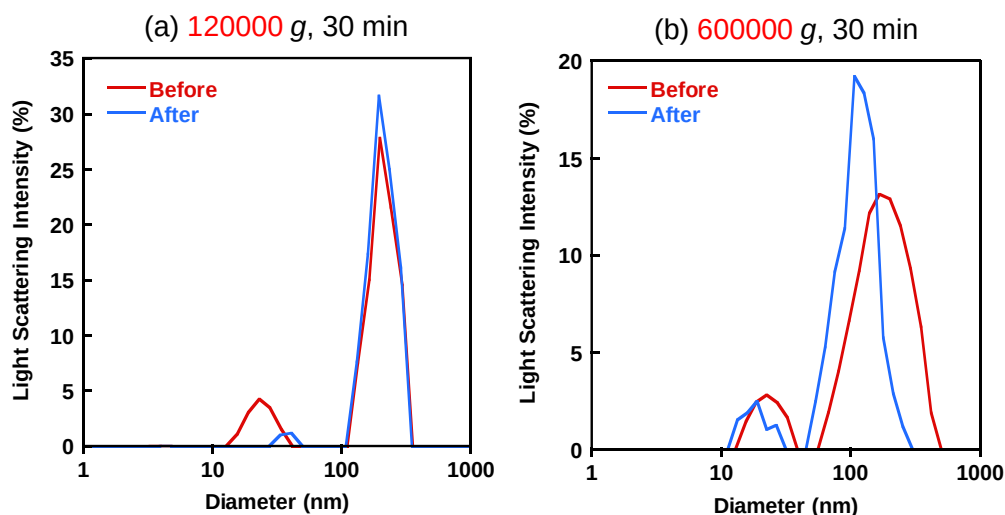


Figure 4-4. DLS profiles of SWNT/PNIPAM before and after the ultracentrifugation at (a) 120000 g and (b) 600000 g .

続いて Figure 4-5 に、各再分散溶液の AFM 像および AFM 像から作成した長さヒストグラムを示す。AFM 像を見ると、ともに多数の棒状粒子が観察されたものの、600000 g で遠心後には明らかに短い粒子が増えていた。さらに各 AFM 像から作成した長さヒストグラムより、600000 g で遠心後には 500 nm 以上の粒子が観察されなくなり短い粒子の割合が増えていることから、SWNT/PNIPAM の切断が示唆された。また、各 AFM 像から 120000 g で超遠心分離後の粒子の平均長さは 479.0 nm、600000 g で超遠心分離後の粒子の平均長さは 189.9 nm と算出された。600000 g という非常に大きな重力加速度では、わずか 30 分の超遠心分離でがん治療に最適な長さの SWNT/PNIPAM が得られることがわかった。

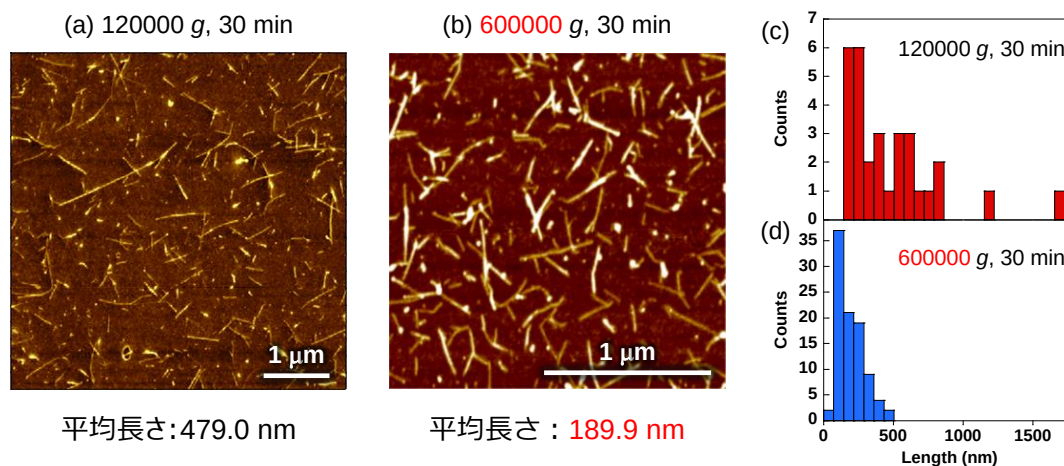


Figure 4-5. (a) AFM image and (c) length histogram of SWNT/PNIPAM after the ultracentrifugation at 120000 *g*. (b) AFM image and (d) length histogram of SWNT/PNIPAM after the ultracentrifugation at 600000 *g*.

さらに、**Figure 4-6** に 600000 *g* で超遠心分離後の再分散溶液の吸収スペクトル測定の結果を示す。吸光度の値が遠心分離前後でほとんど変化していないことから、収率は 100% 近いことがわかった。この収率は、短い SWNT を選択的に分離する方法 (収率 ~50%)^{13,15,19} と比較して非常に高い。短いものだけを分離した場合収率が 100% 近くにまでなることはあり得ないため、超遠心分離により得られた短い SWNT/PNIPAM は、選択的に分離されたのではなく切断により得られたと考えられる。また、切断が起こった後でも SWNT の各カイラリティに由来する吸収ピークの形状はほとんど変化していないことがわかる。SWNT に欠陥が多数導入されると、これらのピークはブロード化することが知られている²³ ので、超遠心分離による切断では SWNT 構造はほぼ維持されることが考えられた。

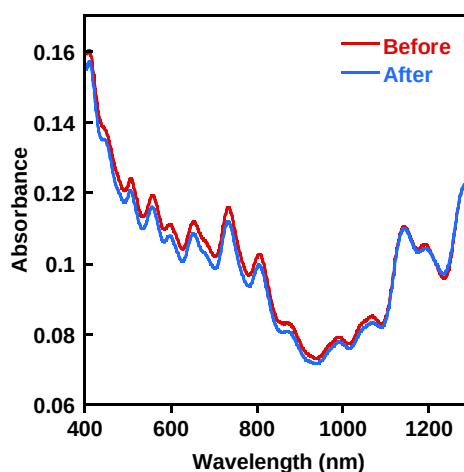


Figure 4-6. Absorption spectra of SWNT/PNIPAM before and after the ultracentrifugation at 600000 *g*.

最後に、**Figure 4-7** に各再分散溶液のラマンスペクトル測定の結果を示す。**Figure 4-7 (a)**, **(b)**はそれぞれ G-band で規格化しているため、D-band の変化から欠陥が導入されたかどうかを調べる事が可能である。それぞれ超遠心分離前の SWNT/PNIPAM と再分散溶液の D-band の大きさを比較すると、120000 *g* で超遠心分離後では大きさに変化はないが、600000 *g* で超遠心分離後ではその増大が測定された。つまり、600000 *g* で超遠心分離を行った場合のみ、SWNT 構造に欠陥が導入されたことになる。この欠陥は、SWNT の切断が起こった際に導入されたと考えられる。

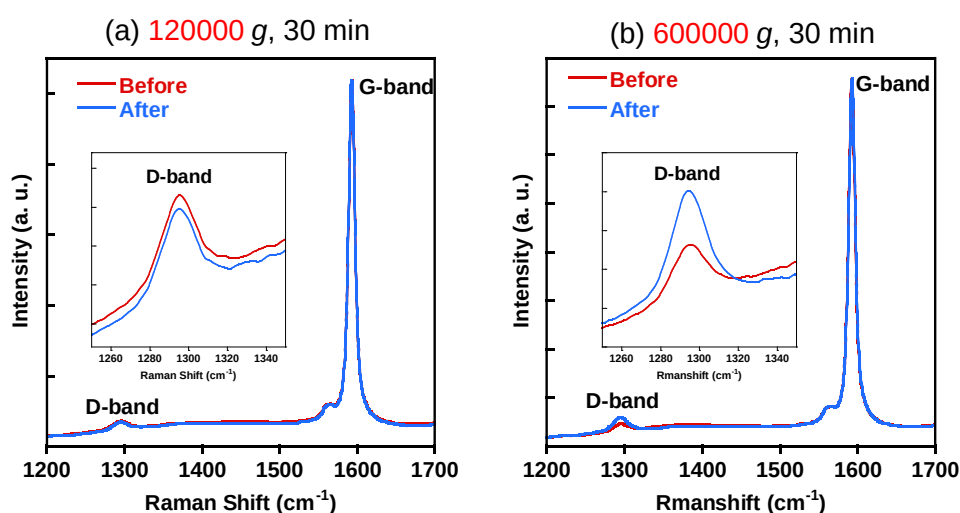


Figure 4-7. Raman spectra of SWNT/PNIPAM before and after the ultracentrifugation at (a) 120000 *g* and (b) 600000 *g*.

以上の結果より、SWNT/PNIPAM に対して 120000 *g* で超遠心分離を行ってもそのサイズ、欠陥存在量に変化はなく、切断は起こらないことがわかった。一方、600000 *g* で超遠心分離を行うとその切断が起こり、切断後の SWNT/PNIPAM はがん治療に最適な 200 nm 程度の平均長さを有することが明らかとなった。さらに、その収率は高く (～100%)、切断後も SWNT 構造に大きな変化を及ぼさないと考えられた。以降の 4-3-2、4-3-3 節では、600000 *g* で行う超遠心分離の「時間」、「回数」が、得られる SWNT/PNIPAM の長さ、欠陥導入量にどのような影響を与えるかを調べていく。

4-3-2. 超遠心分離の「時間」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響

Figure 4-8 に 1、2、5、10 h 遠心分離後の SWNT/PNIPAM の DLS による粒径分布測定の結果を示す。また、併せて遠心分離を行う前の SWNT/PNIPAM 溶液の粒径分布（赤色）も示している。各溶液において、2 つの分布をもつ多分散の粒径分布が得られた。これらは、小さい方の分布は球状の PNIPAM 粒子（副生成物）、大きい方の分布は SWNT/PNIPAM に由来している。この粒径分布より、遠心分離を行うことによって、遠心前よりも小さい粒子の割合が増えていることがわかり、SWNT/PNIPAM の切断が進んでいると考えられた。しかしながら、遠心分離の時間が長くなるにつれて短い粒子の割合が増えるような結果は得られなかった。よって、遠心分離の時間は、SWNT/PNIPAM の長さに対して大きな影響を与えないと考えられた。

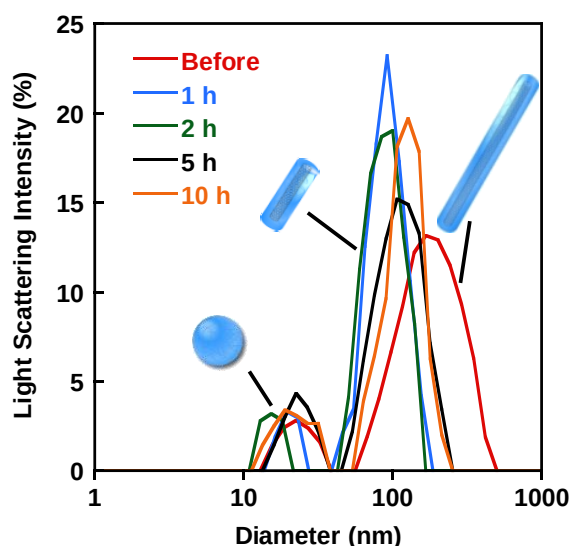


Figure 4-8. DLS profiles of SWNT/ PNIPAM before (red line) and after the ultracentrifugation for 1 h (blue line), 2 h (green line), 5 h (black line) and 10 h (orange line).

続いて、Figure 4-9 に 10 h 遠心分離後の SWNT/PNIPAM の AFM 像と長さヒストグラムを示す。また、0.5 h 遠心分離後の SWNT/PNIPAM の AFM 像（Figure 4-5 に記載）も併せて示している。Figure 4-9 より、10 h 遠心分離後であっても 400 nm を超えるような棒状粒子が観察され、その平均長さは 190.7 ± 122.5 nm と求められた。0.5 h 遠心分離後の SWNT/PNIPAM の平均長さ 189.9 ± 92.8 nm とほぼ同じ値を示したことから、遠心時間を長くしても得られる SWNT/PNIPAM の長さに大きな違いは無いと考えられた。遠心分離の時間が長くなると SWNT/PNIPAM の切断が進み、短い棒状粒子の割合が増えることを期待したが、そのような結果は得られなかった。

以上の AFM 測定、DLS 測定の結果から、遠心分離の「時間」は SWNT/PNIPAM の切断には大きな影響を与えないということがわかった。

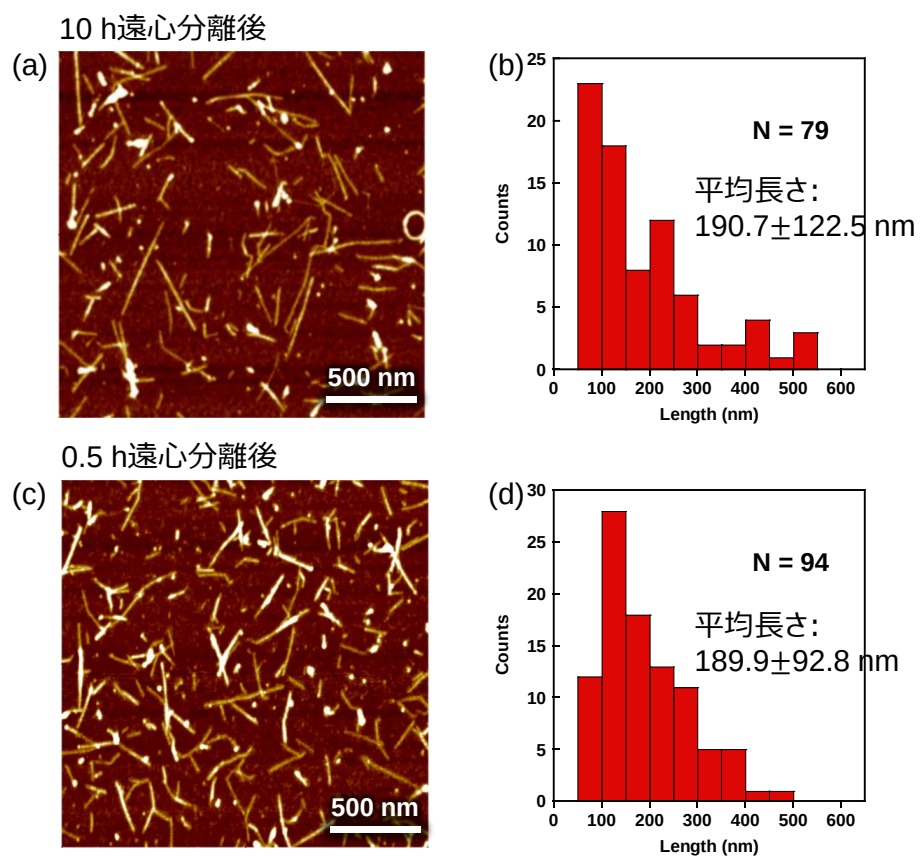


Figure 4-9. AFM images (left) and length histograms (right) of SWNT/PNIPAM after the ultracentrifugation for 10 h (a, b) and 0.5 h (c, d).

4-3-3. 超遠心分離の「回数」が SWNT/PNIPAM の長さに与える影響

Figure 4-10 に 1、2、3、4 回遠心分離後の、SWNT/PNIPAM の粒径分布測定の結果を示す。また併せて遠心分離を行う前の SWNT/PNIPAM 溶液の粒径分布（赤色）も示している。まず、遠心分離前の SWNT/PNIPAM（赤色）では 2 つの分布をもつ多分散を示す粒径分布が得られた。これらは、小さい方の分布は球状の PNIPAM 粒子（副生成物）、大きい方の分布は SWNT/PNIPAM に由来している。続いて 1 回遠心分離後（青色）を見ると、SWNT/PNIPAM に由来する分布のピーク値が、遠心前の 167 nm から 106 nm へと大きく減少しており、SWNT の切断を示唆する結果が得られた。続いて 2 回、3 回遠心分離後ではピーク値がわずかに減少し、4 回遠心分離後にピーク値がさらに減少する結果が得られた。つまり、切断は 1 回目の遠心分離で大きく進み、その後は徐々に短い粒子の割合が増えると考えられた。また、球状粒子に由来する小さい方のピークは 2 回遠心分離後では消えていることから、遠心分離・再分散を 2 回繰り返すとほぼ全て除去出来ると思われた。

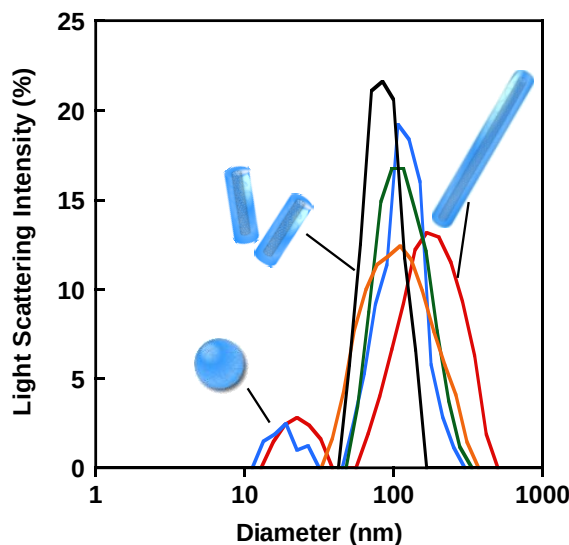


Figure 4-10. DLS profiles of SWNT/PNIPAM before (red line) and after one (blue line), two (green line), three (orange line) and four (black line) ultracentrifugations at 600000 g.

さらに、**Figure 4-11** に 1、2、3、4 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM の AFM 像および AFM 像から作成した長さヒストグラムを示す。AFM 像に基づく長さ分析の結果、1 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM の平均長さは 189.9 ± 92.8 nm (N=94) であったが、その値は 2 回遠心後では 160.9 ± 90.2 nm (N=126) へと減少した。続いて 3 回遠心後では平均長さは 166.0 ± 76.0 nm (N=67) とほとんど変化しておらず、4 回遠心後で 133.5 ± 73.2 nm (N=48) と再び減少した。これらの結果は DLS 測定で得られた結果と良い一致を示している。

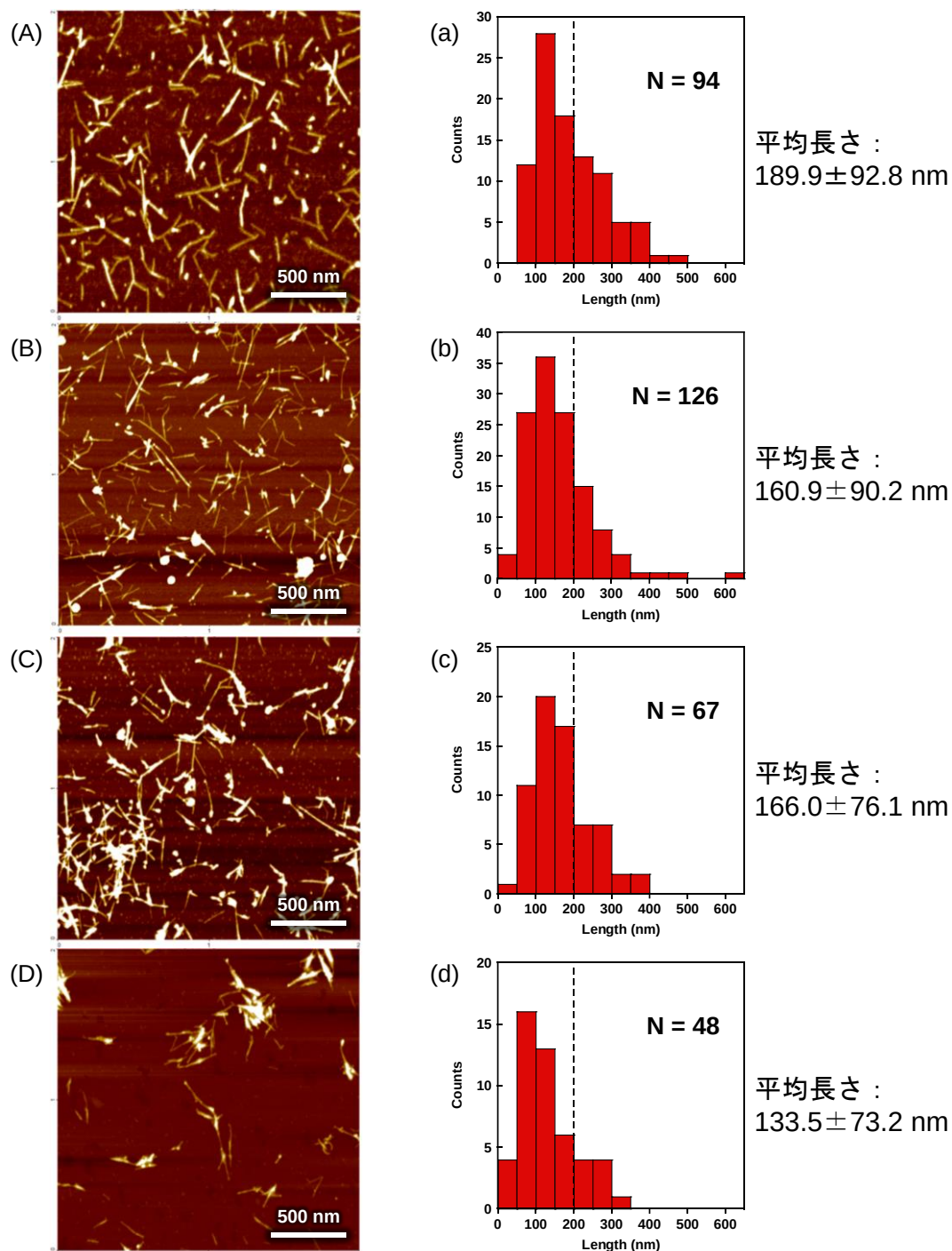


Figure 4-11. AFM images of SWNT/PNIPAM after (A) one, (B) two, (C) three and (D) four ultracentrifugations at 600000 g , and their length histograms for (a) image A, (b) image B, (c) image C and (d) image D. These data are taken from ref. 21.

続いて、**Figure 4-12** に 1、2、3、4 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM のラマンスペクトル測定の結果を示す。また併せて遠心分離を行う前の SWNT/PNIPAM のラマンスペクトル（赤色）も示している。まず、G-band で規格化した D-band を見ると、遠心分離の回数が増えるにしたがって D-band が増加していることがわかる。前述のように D-band は欠陥に由来するピークであるため、遠心分離を行うたびに SWNT の欠陥存在量が増加していることになる。これは、切断面に新たに欠陥が導入されたためであると考えられる。また、SWNT の PL に由来するピークを見ると、遠心分離を行うにつれてピーク強度は減少しているものの、4 回遠心分離後も PL に由来するピークは観察された。SWNT の PL は、SWNT が孤立分散しており、かつ欠陥存在量が限られた場合のみ観察される²⁴ため、切断後であっても SWNT 構造はほぼ維持されていると考えられた。

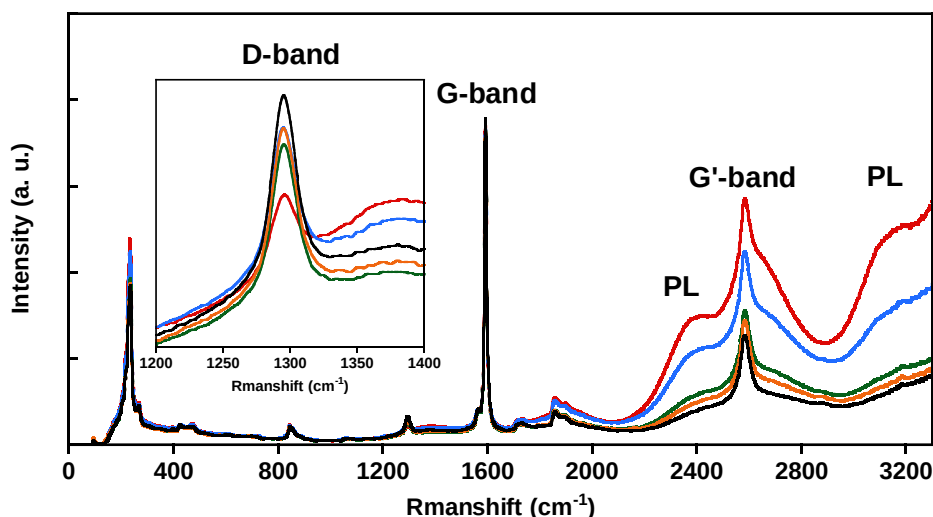


Figure 4-12. Raman spectra of SWNT/PNIPAM before (red line) and after one (blue line), two (green line), three (orange line) and four (black line) ultracentrifugations at 600000 *g*. Excitation wavelength : 785 nm. Data are taken from ref. 21.

最後に、**Figure 4-13** に 1、2、3、4 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM の吸収スペクトル測定の結果を示す。各遠心分離・再分散操作毎に吸光度は元の 90%以上の値が得られた。したがって、収率はかなり高いことがわかる。また、SWNT 由来の吸収ピークの形状はほとんど変化しておらず、SWNT 構造はほぼ維持されていると考えられた。

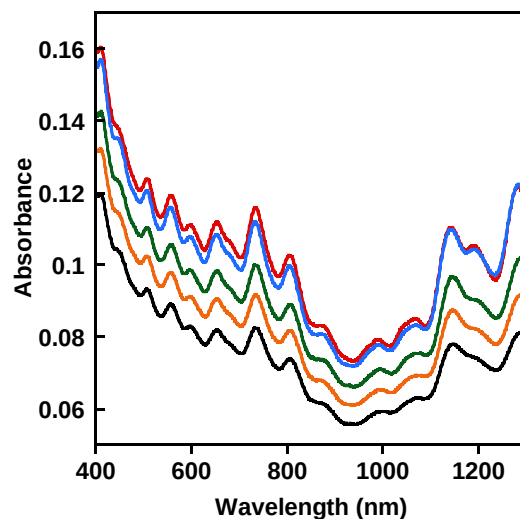


Figure 4-13. Absorption spectra of the SWNT/PNIPAM before (red line) and after one (blue line), two (green line), three (orange line) and four (black line) ultracentrifugations at 600000 *g*. Data are taken from ref. 21.

以上の DLS による粒径分布測定、AFM 測定、ラマンスペクトル測定の結果から、超遠心分離による切断は 1 回目の遠心分離で大きく進み、その後遠心分離の回数を増やすと少しずつ切断が進んでいくことがわかった。したがって、遠心分離の「回数」は SWNT/PNIPAM の切断に影響を与えることが明らかとなった。遠心分離の「時間」よりも「回数」が重要であることから、SWNT/PNIPAM の切断は、遠心分離によって SWNT/PNIPAM が溶液を移動する間に起こっていると考えられる。

1 回目の遠心分離で切断が大きく進むことを証明するために、遠心分離前の PNIPAM 被覆 SWNT の AFM 測定を行って比較したいが、溶液中に存在する副生成物（球状粒子）が邪魔で、観察は困難であった。

4-3-4. 異なる架橋密度を有する SWNT/PNIPAM に対して超遠心分離による切断

ここまで、モノマー：架橋剤の仕込み比＝18：1 で合成した SWNT/PNIPAM に対して超遠心分離による切断実験を行ってきた。本節では、モノマー：架橋剤の仕込み比＝100：1 で合成した架橋密度の異なる SWNT/PNIPAM (100)に対して超遠心分離を行い、PNIPAM 層の架橋密度が SWNT/PNIPAM の切断に与える影響について調べることを目的とした。

まず、新たに合成した SWNT/PNIPAM (100)の評価について述べる。SWNT/PNIPAM (100)の写真を **Figure 4-14** に示す。濃い黒色の溶液が得られ、分散剤 SDS 除去後であっても SWNT は分散状態を維持しているように見えた。



Figure 4-14. Photograph of SWNT/PNIPAM (100).

Figure 4-15 (a)に SWNT/PNIPAM (100)に対して DLS による粒径分布測定を行った結果を示す。SWNT/PNIPAM (100)では、20 nm 付近のピークに加え、100～1000 nm にかけて幅広い粒径分布が得られた。NIPAM：BIS＝18：1 で合成した SWNT/PNIPAM と同様に、10 nm 付近のピークは SWNT を含まない球状粒子に由来し、大きなピークは SWNT/PNIPAM に由来すると考えられる。

次に、SWNT/PNIPAM (100)の吸収スペクトルを **Figure 4-15 (b)**に示す。また、併せて重合に用いた SWNT/0.2 wt% SDS 可溶化溶液の吸収スペクトル（赤色）も示している。この吸収スペクトル測定の結果から、SWNT/PNIPAM (100)のスペクトルは SWNT の可溶化溶液に対し長波長シフトしていることがわかる。これは、SWNT の表面周りの環境が SDS から PNIPAM へと変化し、誘電率が変化したために生じたと考えられる^{25, 26}。また、SWNT/PNIPAM (100)では SWNT の各カイラリティを示すピークが見られるため、SWNT は孤立分散を維持していると言える。さらに 2 つの溶液の吸光度を比較するとほとんど違いが見られないことから、SWNT/PNIPAM (100)の合成においては、合成に用いた SWNT のほぼ全てを利用できていることがわかった。

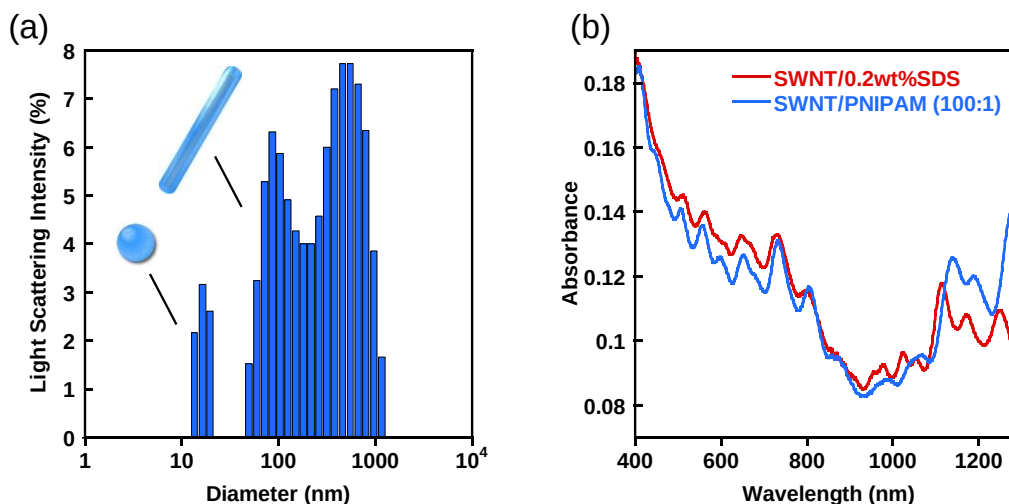


Figure 4-15. (a) DLS profile of SWNT/PNIPAM (100) in an aqueous solution. (b) Absorption spectra of SWNTs solubilized in a 0.2 wt% SDS aqueous solution (red line) and SWNT/PNIPAM (100) in an aqueous solution (blue line).

続いて、SWNT/PNIPAM (100)に対して超遠心分離による切断を試みた結果について述べる。

Figure 4-16 に 1、2、3、4 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM (100)の粒径分布測定の結果を示す。また併せて遠心分離を行う前の SWNT/PNIPAM (100)溶液の粒径分布（赤色）も示している。まず、遠心分離前の SWNT/PNIPAM (100)（赤色）では幅広い粒径分布が得られた。続いて各再分散溶液の粒径分布を見ると、SWNT/PNIPAM (100)に由来する分布のピーク値が、遠心分離を行う度に徐々に減少しており、SWNT/PNIPAM (100)の切断が徐々に進行していることを示唆する結果が得られた。

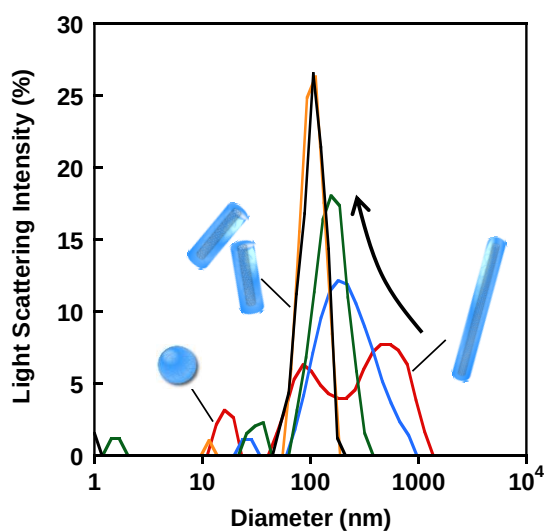


Figure 4-16. DLS profiles of SWNT/PNIPAM (100) before (red line) and after one (blue line), two (green line), three (orange line) and four (black line) ultracentrifugations at 600000 g .

次に、**Figure 4-17** に 1、2、3、4 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM (100) の AFM 像および AFM 像から作成した SWNT/PNIPAM (100) の長さヒストグラムを示す。AFM 像に基づく長さ分析の結果、1 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM の平均長さは 190.1 ± 120.3 nm ($N = 105$) であったが、その値は 2 回遠心後では 182.8 ± 91.8 nm ($N = 81$) へと減少した。続いて 3 回、4 回遠心後では、それぞれ平均長さは 167.7 ± 96.9 nm ($N = 81$)、 158.3 ± 82.3 nm ($N = 105$) と徐々に減少する結果が得られた。これらの結果は DLS 測定で得られた結果と良い一致を示している。また、NIPAM : BIS = 18 : 1 で合成した SWNT/PNIPAM の場合と同様に、長さヒストグラムからは長い粒子 (300 nm 以上) が遠心分離を行うたびに徐々に減少し、短い粒子 (200 nm 以下) の割合が徐々に増加していく結果が得られた。よって、架橋密度が異なっても SWNT/PNIPAM の切断は起こるため、架橋高分子が重要な役割を果たしていることが改めてわかった。しかし、切断における傾向は NIPAM : BIS = 18 : 1 で合成した SWNT/PNIPAM に対して得られた結果と同じであり、架橋密度は超遠心分離による切断に影響を与えないと考えられた。

さらに、AFM 像に基づく高さ分析の結果、1 回、4 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM (100) の平均直径は、それぞれ 2.39 nm、2.40 nm ($N = 50$) と求められた。この結果は、架橋 PNIPAM は超遠心分離中に脱離せず、超遠心分離後も SWNT 上に変わらず存在していることを示している。この特徴は、切断後であっても SWNT/PNIPAM は再分散可能であることに寄与していると考えられる。

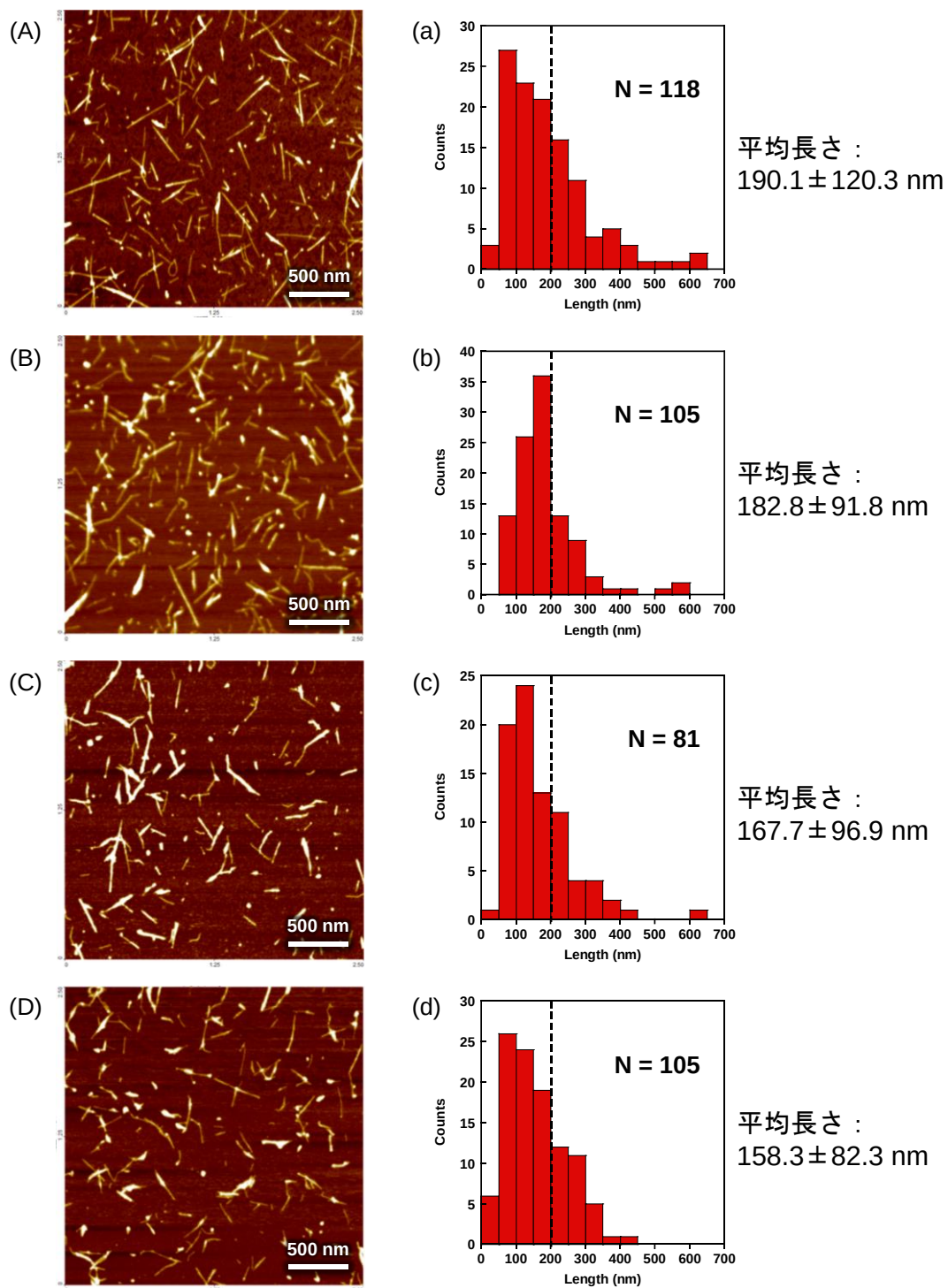


Figure 4-17. AFM images of SWNT/PNIPAM (100) after (A) one, (B) two, (C) three and (D) four ultracentrifugations at 600000 g , and their length histograms for (a) image A, (b) image B, (c) image C and (d) image D. Data are taken from ref. 21.

続いて、**Figure 4-18** に 1、2、3、4 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM (100) のラマンスペクトル測定の結果を示す。また併せて遠心分離を行う前の SWNT/PNIPAM (100) のラマンスペクトル (赤色) も示している。まず、G-band で規格化した D-band を見ると、再分散溶液は遠心分離の回数が増えるにしたがって少しずつ D-band が増加しており、遠心分離を行うたびに SWNT の欠陥存在量が増加していることがわかった。これは、切断面に新たに欠陥が導入されたためであると考えられる。また、SWNT の PL に由来するピークを見ると、遠心分離を行うにつれてピーク強度は少しずつ減少しているものの、4 回遠心分離後も PL に由来するピークは観察されており、遠心分離操作 1 回毎に起こる SWNT 構造の破壊はかなり小さいと考えられた。

さらに、各再分散溶液中の SWNT/PNIPAM (100) において、G-band のピーク面積に対する D-band のピーク面積 (I_D/I_G) を求め、SWNT/PNIPAM (100) の平均長さと比較すると、190.1、182.8、167.7、158.3 nm の長さを有する SWNT/PNIPAM (100) の I_D/I_G は、それぞれ 0.044、0.058、0.076、0.082 と求められた (I_D/I_G は、その値が大きいほど欠陥が多く存在していることを示している)。一方 Fagan らは、サイズ排除クロマトグラフィーにより長さ分離した 220 nm、120 nm の SWNT の I_D/I_G は、それぞれ 0.03、0.04 と報告している²⁷。短い SWNT の方が I_D/I_G が大きいのは、欠陥濃度が高い SWNT 末端が占める割合が大きいためであると彼らは説明している²⁷。本研究で切断した SWNT/PNIPAM (100) の I_D/I_G の変化 (190.1 nm→158.3 nm のとき 0.044→0.082) を、Fagan らの報告 (220 nm→120 nm のとき 0.03→0.04) と比較すると、SWNT/PNIPAM (100) の方が I_D/I_G の増加量大きい。つまり、SWNT/PNIPAM は末端のみならず側面にも多少欠陥が導入されていると考えられた。

以上より、超遠心分離で切断した SWNT/PNIPAM には、長さ分離した短い SWNT よりも多くの欠陥が生じている。しかしながら、それでも化学的処理²⁸、機械的処理²⁹、もしくはその 2 つの組み合わせ ($I_D/I_G = \sim 4$)¹⁰ による切断方法と比較するとその I_D/I_G の値は小さく、過去に報告された多くの切断方法よりも遙かに温和な条件で、切断による SWNT の短尺化が行えることが明らかとなった。

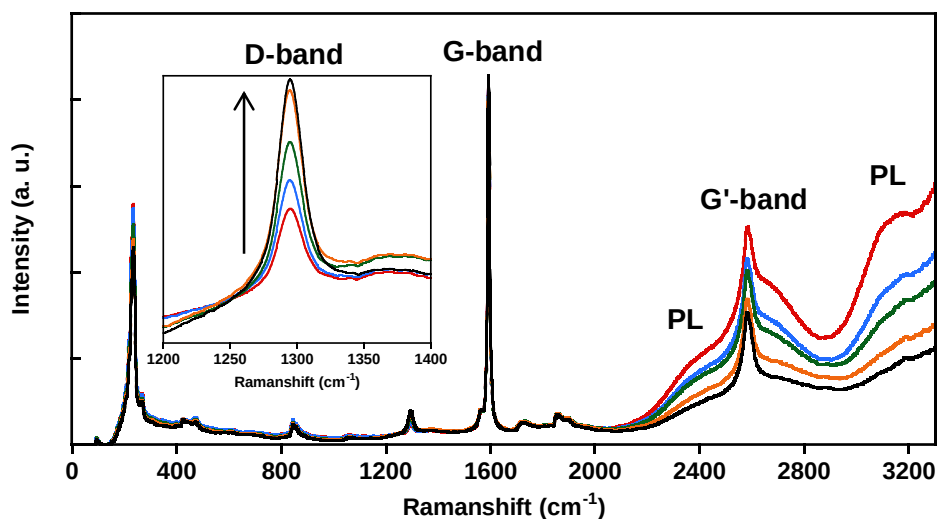


Figure 4-18. Raman spectra of SWNT/PNIPAM (100) before (red line) and after one (blue line), two (green line), three (orange line) and four (black line) ultracentrifugations at 600000 *g*. Excitation wavelength : 785 nm. Data are taken from ref. 21.

最後に、**Figure 4-19** に 1、2、3、4 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM (100) の吸収スペクトル測定の結果を示す。SWNT 由来の吸収ピークの形状はほとんど変化しておらず、この結果も、SWNT 構造はほぼ維持されていることを支持している。各遠心分離・再分散操作毎に吸光度は元の 90% 以上の値が得られた。特に、1 回遠心分離後の吸光度の減少はわずか 6% であり、生体応用に最適な長さ (< 200 nm) を有する SWNT の収率は、長さ分離に基づく手法の収率 (~50%)^{13, 15, 19} と比べて非常に高いことがわかった。

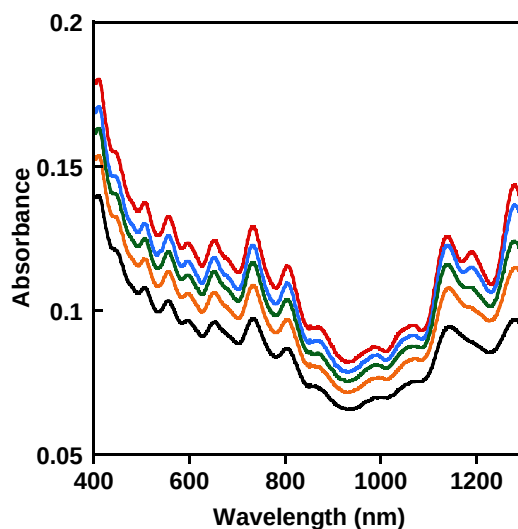


Figure 4-19. Absorption spectra of the SWNT/PNIPAM before (red line) and after one (blue line), two (green line), three (orange line) and four (black line) ultracentrifugations at 600000 *g*. Data are taken from ref. 21.

本手法による SWNT/PNIPAM の短尺化は、クロマトグラフィーや DGU、遠心分離などの長さ分離に基づく手法と比較して、次の 4 つの点で優れている。それは(i) 高収率、(ii) 簡便、(iii) 短時間、(iv) 低コストである。順に説明すると、(i) 200 nm 以下の SWNT/PNIPAM の収率はほぼ 100%であり、クロマトグラフィー^{13,15}や遠心分離¹⁹などを利用した長さ分離に基づく手法の収率（～ 50%）よりもずっと大きい。(ii) 本手法で行う操作は遠心分離のみである。一方、DGU や遠心分離では数種類の溶液調製など煩雑な操作を含む¹⁷⁻²⁰。(iii) 本手法の各遠心分離操作はわずか 30 分である一方、DGU や遠心分離では長時間を要する（数時間～十数時間）¹⁷⁻²⁰。(iv) 他の手法は数種類の試薬を使用する¹⁷⁻²⁰ためより高コストである。

4-3-5. SWNT/PNIPAM-PEG に対して超遠心分離による切断の適用

遠心分離に基づく SWNT の切断は初めての報告である。本手法では、SWNT の近赤外域における吸収・発光といった光学特性を有しながら、生体応用に最適な長さ（100～200 nm）の SWNT/PNIPAM を高収率で得ることが出来る。そこで、生体親和性の高い PEG を有する SWNT/PNIPAM-PEG に対しても本手法を適用し、切断を試みた。さらに、切断後の SWNT/PNIPAM-PEG に対して PBS buffer 中への再分散を試みた。

Figure 4-20 (a)に 1、2 回超遠心分離後の SWNT/PNIPAM-PEG の散乱強度ヒストグラムを示す。また併せて遠心分離を行う前の SWNT/PNIPAM-PEG 溶液の散乱強度ヒストグラム（赤色）も示している。まず、遠心分離前の SWNT/PNIPAM-PEG 溶液（赤色）では幅広い粒径分布が得られ、そのピーク値は 206 nm であった。続いて 1、2 回遠心分離後の粒径分布は、SWNT/PNIPAM の場合と同様に、SWNT/PNIPAM-PEG に由来する分布のピーク値が遠心分離の度に徐々に減少した。2 回遠心分離後の粒径分布のピーク値は 117 nm であり、SWNT/PNIPAM-PEG の切断が起こったことがわかった。さらに、2 回遠心分離後の SWNT/PNIPAM-PEG を凍結乾燥し PBS buffer (pH 7.4)中へと再分散させたところ、SWNT/PNIPAM-PEG を切断後であっても **Figure 4-20 (b)**のように安定な分散状態を有する溶液が得られた。従って、得られた物体は、DDS、光熱治療、バイオイメージングなど様々なバイオ分野への応用が期待できる有望なナノバイオマテリアルであると言える。

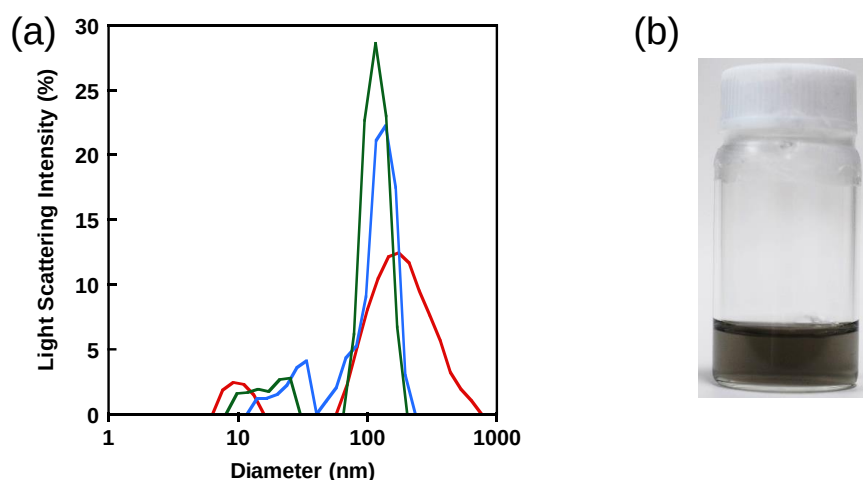


Figure 4-20. (a) DLS profiles of SWNT/PNIPAM-PEG before (red line) and after one (blue line) and two (green line) ultracentrifugations at 600 000g. (b) Photographs of SWNT/PNIPAM-PEG after one ultracentrifugation at 600000 g in a PBS buffer solution (pH 7.4). Data are taken from ref. 21.

4-4. まとめ

架橋 PNIPAM 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM) に対して、 $600000 \times g$ の超遠心分離をわずか 1 回行うのみで、生体応用に最適な長さ (100~200 nm) を有する SWNT/PNIPAM が得られることが、DLS による粒径分布測定、AFM 測定の結果からわかった。さらに、ラマンスペクトル測定、吸収スペクトル測定の結果から、SWNT の表面構造や光学特性 (近赤外域での吸収・発光) は、切断後であってもあまり変化しないことが明らかとなった。また、遠心分離の「回数」を増やすと徐々に切断が進んでいく一方で、遠心分離の「時間」は切断に影響を与えないことがわかった。したがって、SWNT/PNIPAM の切断は、遠心分離によって SWNT/PNIPAM が溶液を移動する間に起こっていると考えられた。また、SWNT/PNIPAM-PEG に対しても超遠心分離による切断は可能であり、切断後も buffer 中で安定に分散可能であることがわかった。

本章で示した超遠心分離による切断方法は、短時間 (30 分) のシンプルな操作 (超遠心分離のみ) で、100~200 nm の SWNT/PNIPAM (および SWNT/PNIPAM-PEG) が高収率で得られる。切断後の架橋高分子被覆 SWNT は、生体応用に最適な長さであり、かつ SWNT の光学特性を維持しているため、DDS や光熱治療、バイオイメージングなどががん診断・治療薬としての応用が期待できる有望なナノバイオマテリアルである。

参考文献

1. H. Ali-Boucetta, A. Nunes, R. Sainz, M. A. Herrero, B. Tian, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 2274.
2. J. Muller, M. Delos, N. Panin, V. Rabolli, F. Huaux, D. Lison, *Toxicol. Sci.* **2009**, 110, 442.
3. K. Yamashita, Y. Yoshioka, K. Higashisaka, Y. Morishita, T. Yoshida, M. Fujimura, H. Kayamuro, H. Nabeshi, T. Yamashita, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, Y. Kawai, T. Mayumi, T. Yoshikawa, N. Itoh, S.-i. Tsunoda, Y. Tsutsumi, *Inflammation* **2010**, 33, 276.
4. J. Kolosnjaj-Tabi, K. B. Hartman, S. Boudjemaa, J. S. Ananta, G. Morgant, H. Szwarc, L. J. Wilson, F. Moussa, *ACS Nano* **2010**, 4, 1481.
5. C. A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W. A. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. Macnee, K. Donaldson, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 423.
6. B. Kang, S. Chang, Y. Dai, D. Yu, D. Chen, *Small* **2010**, 6, 2362.
7. J. Liu, A. G. Rinzier, H. Dai, J. H. Hafner, R. Kelley 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, R. E. Smalley, *Science* **1998**, 280, 1253.
8. J. Zhang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, Z. Du, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 3712.
9. N. Rubio, C. Fabbro, M. A. Herrero, A. de la Hoz, M. Meneghetti, J. L. Fierro, M. Prato, E. Vazquez, *Small* **2011**, 7, 665.
10. F. Ren, S. A. Kanaan, F. Khalkhal, C. Z. Loebick, G. L. Haller, L. D. Pfefferle, *Carbon* **2013**, 63, 61.
11. A. Kuznetsova, I. Popova, J. T. Yates Jr, M. J. Bronikowski, C. B. Huffman, J. Liu, R. E. Smalley, H. H. Hwu, J. G. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10699.
12. D. B. Mawhinney, V. Naumenko, A. Kuznetsova, J. T. Yates Jr, J. Liu, R. E. Smalley, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2383.
13. Y. Yamamoto, T. Fujigaya, Y. Niidome, N. Nakashima, *Nanoscale* **2010**, 2, 1767.
14. B. J. Bauer, M. L. Becker, V. Bajpai, J. A. Fagan, E. K. Hobbie, K. Migler, C. M. Guttman, W. R. Blair, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 17914.
15. C. Y. Khripin, X. Tu, J. M. Heddleston, C. Silvera-Batista, A. R. Hight Walker, J. Fagan, M. Zheng, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 1382.
16. D. A. Heller, R. M. Mayrhofer, S. Baik, Y. V. Grinkova, M. L. Usrey, M. S. Strano, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14567.
17. X. Sun, S. Zaric, D. Daranciang, K. Welsher, Y. Lu, X. Li, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6551.
18. Y. Kuang, J. Liu, X. Sun, *J. Phys. Chem. C* **2012**, 116, 24770.

19. J. A. Fagan, M. L. Becker, J. Chun, P. Nie, B. J. Bauer, J. R. Simpson, A. Hight-Walker, E. K. Hobbie, *Langmuir* **2008**, *24*, 13880.
20. J. A. Fagan, M. L. Becher, J. Chun, E. K. Hobbie, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1609.
21. Y. Tsutsumi, T. Fujigaya, N. Nakashima, *Nanoscale* **2015**, *7*, 19534.
22. D. F. Chowdhury, Z. F. Cui, *Carbon* **2011**, *49*, 862.
23. F. Hennrich, R. Wellmann, S. Malik, S. Lebedkin, M. M. Kappes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 178.
24. C. Georgi, M. Böhmler, H. Qian, L. Novotny, A. Hartschuh, *Phys. Status Solidi B* **2009**, *246*, 2683.
25. S. Berger, F. Iglesias, P. Bonnet, C. Voisin, G. Cassaboïs, J.-S. Lauret, C. Delalande, P. Roussignol, *J. Appl. Phys.* **2009**, *105*, 094323.
26. S. Chiashi, S. Watanabe, T. Hanashima, Y. Homma, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3097.
27. J. A. Fagan, J. R. Simpson, B. J. Bauer, S. H. D. P. Lacerda, M. L. Becker, J. Chun, K. B. Migler, A. R. H. Walker, E. K. Hobbie, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10607.
28. Z. Chen, K. J. Ziegler, J. Shaver, R. H. Hauge, R. E. Smalley, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 11624.
29. B. Gao, C. Bower, J. D. Lorentzen, L. Fleming, A. Kleinhammes, X. P. Tang, L. E. McNeil, Y. Wu, O. Zhou, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *327*, 69.

5 章

結言

第 1 章では、CNT の基本特性を交えながらバイオ分野、特にがん診断・治療薬としての利点についてこれまでの研究例を使用し述べた後、CNT を分散させるための表面修飾法について紹介した。

第 2 章では、SWNT と界面活性剤ミセル間のナノ空間を「重合場」として利用し、「架橋高分子」を合成することによる新規 SWNT 表面修飾手法について報告した。高分子として poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) を使用して合成した PNIPAM 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM) に対して詳細な評価を行った結果、SWNT は表面構造をほとんど維持したまま、孤立分散状態を維持していることがわかった。さらに、共重合により架橋高分子層の機能が可能であることがわかり、poly(ethyleneglycol) (PEG) を導入した PNIPAM-PEG 被覆 SWNT (SWNT/PNIPAM-PEG) の架橋 PNIPAM-PEG 層は、加熱、凍結乾燥・再分散、多量の界面活性剤添加に対して高い被覆安定性を有することが明らかとなった。この高い被覆安定性は、架橋高分子層を介した低分子の吸着・脱離をも可能にし、SWNT/PNIPAM-PEG の DDS への応用が期待できる結果が得られた。また、本手法では SWNT と強い相互作用を持たないポリマーも利用可能であり、これまで作製が困難であった CNT/ポリマー複合体の合成をも達成できる可能性が示された。さらには、共重合による架橋高分子層の機能化を利用し、蛍光色素やリガンドの導入により、がん診断・治療薬への応用に向けた複合体のデザインをも可能になると考えられる。

第 3 章では、2 章で報告した「ミセル内部空間を重合場として利用した架橋高分子合成法」を一般化するため 7 つのモノマーを用いて複合体作製を試み、どのような合成条件の時に架橋高分子被覆 SWNT の合成が可能であるか調べた。その結果、モノマーとして Poly(ethyleneglycol) methacrylate、*N,N*-dimethylacrylamide、methyl methacrylate、vinyl acetate、methyl acrylate を用いた場合には高収率（75%以上）で架橋高分子被覆 SWNT を合成でき、様々な新規 SWNT/高分子複合体を合成可能であると示すことが出来た。一方、acrylamide を用いた場合には収率（40%以下）が低く、2-hydroxyethyl methacrylate を用いた場合には架橋高分子被覆 SWNT の合成自体困難であった。続いて、各複合体の溶液に対して評価を行ったところ、高収率で架橋高分子被覆 SWNT が得られた場合にはナノ粒子が、低収率で架橋高分子被覆 SWNT が得られた場合にはマイクロサイズの物体が共存していることが明らかとなった。ナノ粒子はミセル内部空間で、マイクロサイズの物体はミセル外部で重合が進んだ結果得られたと考えられ、「ミセル内部で選択的に重合が進む合成条件の選択」が、架橋高分子被覆 SWNT 合成のための必要条件であるということがわかった。

第 4 章では、SWNT/PNIPAM に対して 600000 *g* で「超遠心分離」を行うと、その切断が起り、わずか 1 回（30 分）の遠心で生体応用に最適な長さ（100～200 nm）をもつ

SWNT/PNIPAM が得られることを述べた。切断後の SWNT/PNIPAM に対して分光学的評価を行った結果、SWNT の表面構造や光学特性（近赤外域での吸収・発光）は、切断後であってもあまり変化しないことが明らかとなった。超遠心分離による切断は、これまでに報告された CNT 切断方法と比較し、温和な条件での切断が可能である。さらに、短い CNT を選択的に分離する手法と比較すると、高収率、簡便、短時間、低コストという利点を有している。本手法で得られた切断後の架橋高分子被覆 SWNT は、生体応用に最適な長さであり、かつ SWNT の光学特性を維持しているため、DDS や光熱治療、バイオイメージングなどががん診断・治療薬としての応用が期待できる有望なバイオナノマテリアルと言える。

本論文では、新規 CNT 表面修飾手法を開拓し、この手法で得られた架橋高分子被覆 SWNT に対して詳細な評価を行った。今後、*in vitro*、*in vivo* での長期にわたる毒性評価が必要ではあるものの、これまでの報告から考えると毒性は極めて低いと思われ、バイオ分野への応用が大いに期待できるナノマテリアルである。特に切断後の架橋高分子被覆 SWNT は、架橋高分子層に対してがん集積性、血中滞留性を高めるためにリガンド（ペプチド、抗体など）、長鎖 PEG などの導入を今後行うことで、効率的ながん診断・治療が可能になると期待できる。

謝辞

本研究を行うにあたりまして、終始懇切なる御指導を賜りました九州大学大学院工学研究院 中嶋直敏 教授に厚く御礼を申し上げます。

本論文の執筆にあたり、有益なご教示、ご助言をいただきました九州大学大学院工学研究院 田中敬二 教授、後藤雅宏 教授に心より感謝致します。

学部4年、大学院修士課程、博士課程にわたり、実験や論文執筆、生活面に至るまで直接御指導、御鞭撻を賜りました九州大学大学院工学研究院 藤ヶ谷剛彦 准教授に感謝の意を表します。

有益な御教示、御助言を頂きました鹿児島大学大学院理工学研究科 新留康郎 准教授、九州大学大学院工学研究院 白木智丈助教授に感謝いたします。

実験サポートあるいは討論いただきました田中泰彦特任助教、小澤寛晃特任助教、井手奈都子技官、利光史行学術研究員、福丸貴弘学術研究員、Kim Chaerin 学術研究員、Juhasz Gergely Miklos 学術研究員、Nikolay Dementev 学術研究員、Mohamed Reda Berber 学術研究員、Hong Liu 学術研究員、Park Jin sung 学術研究員、廣渡和生技術職員、Inas Hazzaa Hamed Hafez 技術職員、内山直行氏、柳裕之氏、今津直樹氏に感謝いたします。

研究生生活において、事務的なサポートをしていただきました大坪友美氏、手塚由貴代氏、谷口裕子氏に感謝致します。

研究生生活におきまして、多大なサポートを頂きました当研究室の、劉慶豊氏、劉風国氏、加藤雄一氏、平兮康彦氏、内海剛志氏、山本悠喜氏、中村友紀氏、樋口由香氏、佐田貴生氏、ユジョンテ氏、木谷綾花氏、多賀優美氏、赤崎浩二郎氏、関口正憲氏、新留頌一郎氏、鶴由貴子氏、Yang Zehui 氏、井上彩花氏、藤井政徳氏、藤川尚之氏、宮崎大悟氏、森田潤一氏、齊藤千織氏、三枝裕典氏、續明子氏、平田信介氏、黄文シン氏、白石智也氏、長嶋昌代氏、福澤将史氏、石丸航氏、内田晃一朗氏、キムテミン氏、キムガヨン氏、金森亮太氏、HANHOON 氏、Weerathunga don Terrence Dhammika 氏、Shi Yilei 氏、鬼塚 悠氏、韓 自依氏、中島 祐樹氏、大園 啓太氏、西村 加奈子氏に感謝いたします。

苦楽を共にし、励ましあった研究室同期の濱崎祐樹氏に感謝いたします。

最後になりましたが、これまで私を育て、温かく見守って下さった家族、知人、友人に心から感謝致します。

2016 年 3 月 堤 優介