

図1 BN-NTsの外観（左）とSEM像（右）

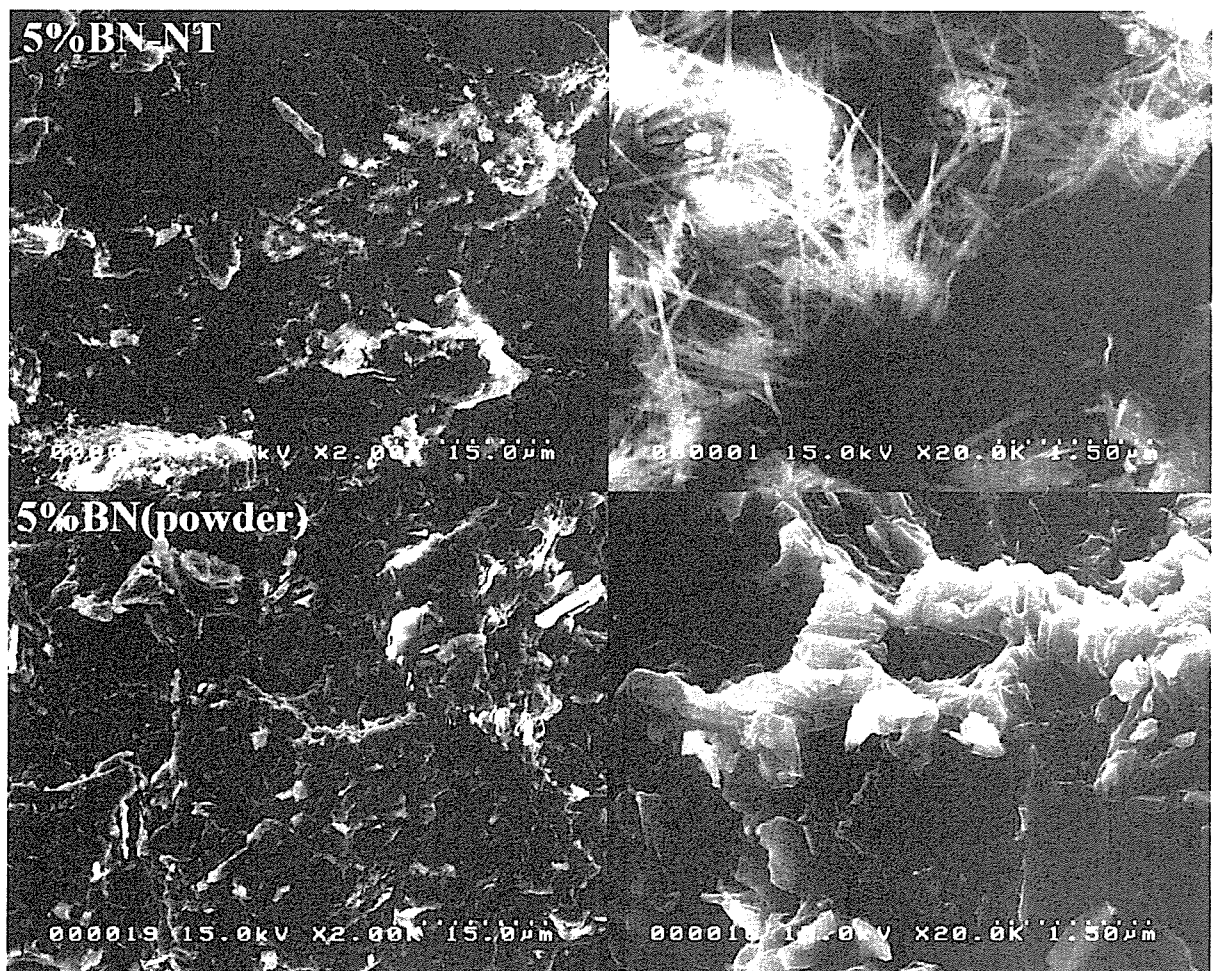
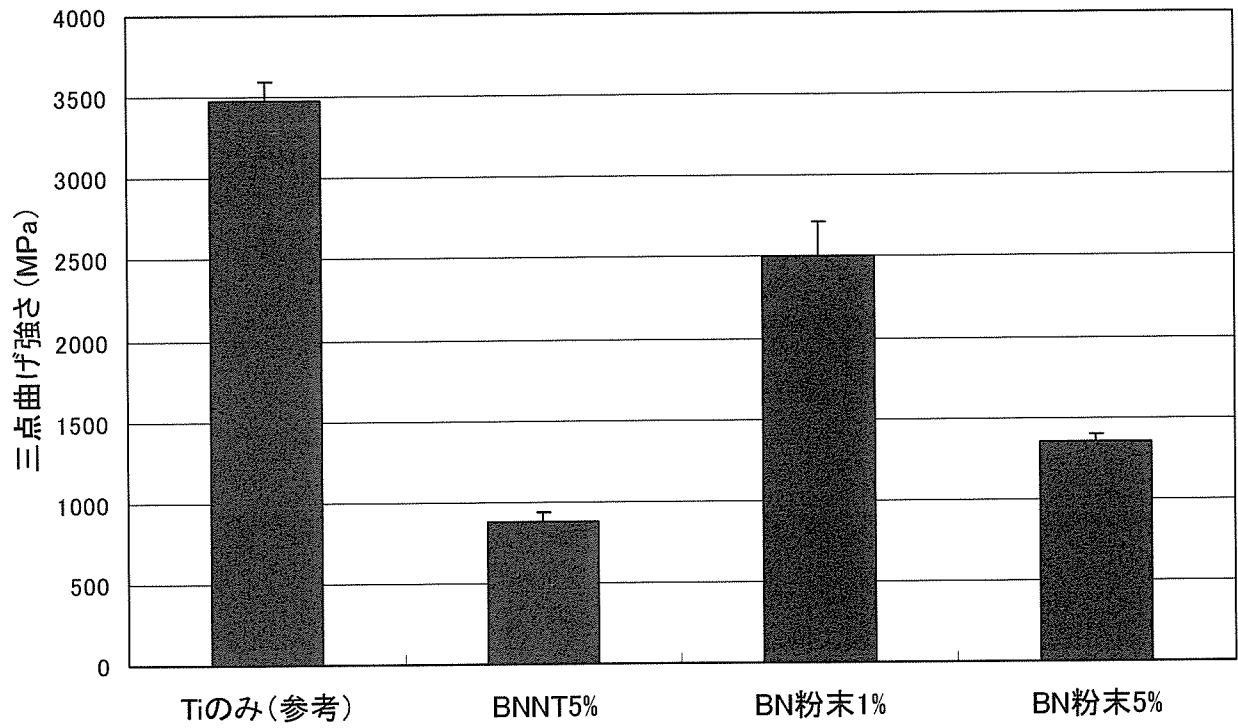


図2 BN-NTs/Ti 複合材およびBN粉末/Ti 複合材のSEM像（左：弱拡大、右：強拡大）

SPS焼結体の三点曲げ強さ(支点間15mm)



SPS焼結体の縦弾性係数(三点曲げ試験時: 支点間15mm)

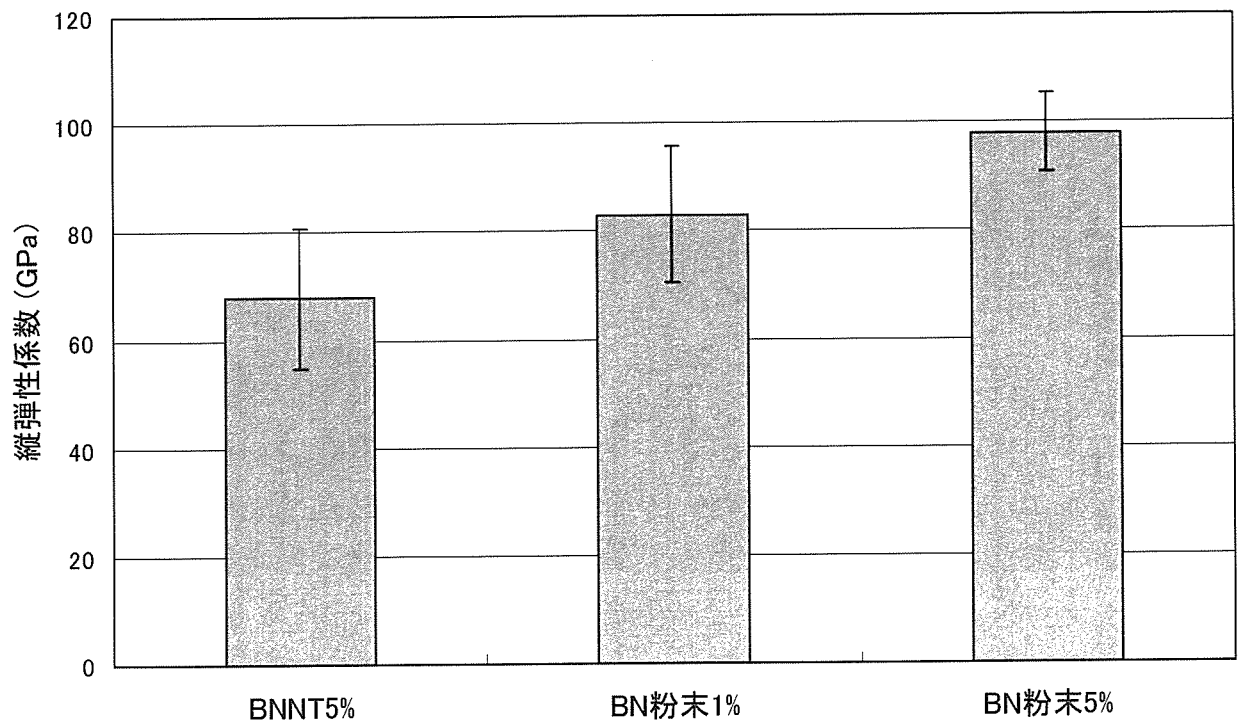


図3 SPS 焼結体の曲げ試験結果 (上: 曲げ強さ, 下: 縦弾性係数)

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

イメージング質量分析を用いた生体組織評価（1）

分担研究者 田路和幸  
研究協力者 佐藤義倫  
研究協力者 韭澤 崇

東北大学大学院環境科学研究科教授  
東北大学大学院環境科学研究科助手  
ブルカー・ダルトニクス株式会社

**研究要旨** フラーレンは非常に安定な構造 ( $sp^2$  構造) を有し、化学修飾により水溶化も可能である材料である。化学修飾部位では、フルーレンを構成している炭素が  $sp^3$  結合になるため、エネルギーを与えられると容易に「フルーレン」と「化学修飾基」に解離することが知られている。このようなフルーレン誘導体は質量分析中でのイオン化の段階で解離を起こし、もとの分子構造の持つ質量を観測することはできない。本研究では、フルーレン誘導体の「解離しやすい」という性質を逆手にとって利用したものである。例えば、目的の疾患マーカーに選択的に結合するような水溶化フルーレンを設計して生体組織に導入し、疾患マーカー部分だけにフルーレン誘導体を結合させた後、飛行時間型質量分析計 (TOF-MS: time-of-flight Mass spectrometry) によるイメージング質量分析を行って解離イオンであるフルーレンを測定することにより、生体内のどの部位にフルーレン誘導体が濃縮しているのかイメージング像を撮ることができる。フルーレンの代謝による位置情報などの獲得が実現すれば、この画期的技術は、フルーレンによるドラッグデリバリーシステム、さらにはナノトキシコロジー分野においても幅広く利用されていくものと期待される。本年度は、イメージング質量分析により水溶化フルーレンの体内動態可視化を試み、フルーレンの生体内での代謝分布評価法としての予備実験を報告する。

## A. 研究目的

### A-1. 生化学領域における質量分析

ヒトゲノムの解読が完了した2000年以降、ポストゲノム研究としてプロテオミクス解析が広く行われている<sup>16</sup>。プロテオミクスは、生体内で遺伝子から翻訳されて合成される膨大な種類のタンパク質を網羅的に同定・解析することで生体メカニズムの解明や疾患の治療法の開発に役立てようと、タンパク質を扱うプロテオーム解析 (proteome; protein+genome の造語)、ペプチドを扱うペプチドーム解析 (peptidome; peptide+genome)、糖鎖および糖ペプチド、糖タンパク質を扱うグライコーム解析 (glycome;

glycogen+genome) を駆使し、生体内の機能に関する解明を試みる学問である<sup>7-10</sup>。その中でも、特に疾患をターゲットに研究を行う“臨床プロテオーム解析”が注目されている<sup>11-13</sup>。この分野での試料は一般に極微量であることが多く、高感度で、かつ得られる情報量の多い分析方法が必要とされており、それを満たす手法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) が広く使用されている。一般に、正常および疾患検体から採取した血清、血漿や髄液等を簡易精製した後に質量分析を行い、得られた正常/疾患

の複数のスペクトルパターンから解析ソフトウェアを用いたクラスター解析およびバイオマーカー（その存在によって正常・疾患を区別できる物質）探索を行う研究である<sup>14,15</sup>。

近年、発見されたバイオマーカーをターゲットとし、生体組織内でそのマーカーがどの部位に存在するかを2次元的に可視化し、モニタリングおよび解析を行うことができる“イメージング質量分析”が注目されている。この方法は疾患がどの部位にどの程度存在するかを視覚的にとらえることが可能な唯一の方法と言える<sup>16</sup>。これらの研究は、テーラーメイド医療、診断および治療の実現に結びつく、非常に重要な領域である。一方、ナノテクノロジーの進歩も生化学領域に及び、テーラーメイド医療に向けての研究が進められている。選択的部位に薬物投与を目的とするドラッグデリバリーシステム（DDS）、癌治療を目指す磁性粒子ハイパーサーミア、同時にこれらのナノバイオテクノロジーに使用されるナノ材料（ナノ粒子、フラーレン、カーボンナノチューブ）の体内への影響を研究するナノトキシコロジー等がさかんに行われており、各種異分野の融合が今後のプロテオミクス研究に必要不可欠である。これらの複合的プロテオミクス研究に質量分析を応用する際には、いくつかの課題が生じる。包括的プロテオーム解析という観点から、測定の高スループット化、再現性向上、および目的物質の比較定量化、またナノテクノロジー分野では投与する薬剤自体の厳密な素材評価、さらに臨床プロテオーム解析では多検体解析への対応等といった問題が挙げられる。それらを解決することに加え、臨床プロテオーム解析で重要なバイオマーカーの位置情報、イメージング質量分析による新規ナノテクノロジーDDS 薬剤の生体内到達部位の位置情報、ナノ材料の代謝による位置情報などの獲得が実現すれば、この画期的技術は、これからのプロテオミクス解析、さらには臨床医療分野やナノテクノロジー分野においても幅広く利用されていくものと期待される。

## A-2. マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

一般に質量分析装置は、試料をイオン化する部分（イオン源）と、イオンを質量の違いによって分離する部分（分析計）に大きく分けられる。イオン化

法の1つであるMALDI（図1）と分析法の1つであるTOF（図2）を組み合わせたMALDI-TOF-MS（Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry：マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析）は、タンパク質のような分子量100 kDaを超える化合物までも分解させずに測定できるMALDI（Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization）のソフトなイオン化と、TOF（Time-Of-Flight）の操作性の良さにより、生体高分子における質量分析法としてMALDI-TOFは一般的なものになりつつある。

MALDIは数あるイオン化法の中の一つであり、文字通り試料がマトリックスに支援されてレーザー脱離・イオン化される方法である。これは、試料そのものにレーザー照射して脱離・イオン化を行う従来のLD（Laser-Desorption:レーザー脱離）に改良を加えた方法と言える。LDとの違いはマトリックスの存在のみであるが、LDではうまく脱離又はイオン化されないことの多い生体高分子試料に対して非常に有効な手法である。図1に示すように、試料・マトリックス混合結晶に高密度なレーザー光（窒素レーザー（337 nm）が用いられることが多い）が照射されると、まずはマトリックスがレーザーの光子を吸収して励起状態に達し、それと同時に結晶の温度が上昇して試料もろとも脱離（昇華）する。これによって試料単体ではうまく脱離しないものでも「マトリックス支援」によって脱離されることになる。次に、蒸発した試料は高い励起状態にあるマトリックスによって化学的イオン化を受ける。その過程はいくつか考えられるが、多くの場合はマトリックス分子から解離したプロトンが試料分子に移動して見かけ上イオン化された状態になる（擬分子イオン化）。

TOFとは「飛行時間型」のことで、磁場型やイオントラップと並ぶイオン分離法の一つである。その概略を図2に示す。レーザー照射によって生成されたイオンを電場によって加速する。この時に低分子量のイオンは速く、高分子量のイオンは遅く飛行するため、分子量ごとに飛行時間が異なることになる（これは運動エネルギーの方程式、 $E=(1/2)mv^2$ で単純に理解できる。Eは電場の大きさとイオンの電荷で決まるため、イオンの質量数とは関係なく一定と考えることができる。とすれば、mが小さい場合は

v が大きく、m が大きい場合は v が小さくなくてはならない)。最終的にリニア検出器でイオンを検出することで飛行時間を測定し、飛行時間から換算することで分子量を求める(リニアモード測定)。また、反射場(リフレクタ)を用いてイオンを反射させ、飛行しているイオンの時間分布を収束させて高分解能測定を行う場合もある(リフレクタモード)。さらに最近では、一度加速したイオンを再度加速することでMS/MS測定をよりハイスループット・高感度・高精度で行うためのTOF/TOFと呼ばれる装置も開発されている。

### A-3. イメージング質量分析

イメージング質量分析は1996年から研究されるようになった、非常に新しい分析方法である。分析部には一般にMALDI-TOF-MSが用いられ、ターゲットプレートに貼り付けられた薄膜試料、もしくは薄膜状に調製された試料をXY方向に走査するようにレーザーを照射して測定を行う。結果は、測定されたスペクトルの各分子量について、その種類および量をそれぞれ色およびその濃淡で表示させ、イメージングとして出力する。原理的には薄膜でさえあれば試料は生体組織に限定されるものではない。生体組織を例にとると、図3のように試料は生体組織を凍結し、マイクロトームによって5.0 μm ~ 30 μm程度にスライスした凍結切片を用いる。これを導電性のスライドガラス等に固定し、洗浄および乾燥させてから測定に用いる。マトリックスは、測定目的に応じて不連続的に添加、もしくは、スプレーによって均一に添加し、測定を行う。原理的には非常に簡便な装置であるが、イメージング質量分析を行うためには、測定用のソフトウエアおよび2次元に可視化するためのソフトウエアの2つを組み合わせることが不可欠である。Vanderbilt大学のR. M. Caprioliらは、パーキンソン病<sup>17</sup>、脳腫瘍<sup>18</sup>、肺がん<sup>19</sup>、大腸がん<sup>20</sup>、前立腺がん<sup>21</sup>等の腫瘍組織を用いたイメージングや、バイオマーカーの探索を意欲的に進めている。彼らはサンプルの前処理方法等の基礎研究も行っており、現在この分野で世界的にもトップを走るグループと言える<sup>22,23</sup>。Caprioliらによると、図4に示すように、測定は目的によって「プロファイリングモード」および「イメージングモード」で行う。プロファイリングモードでは、マトリックスを

不連続的にスポットし、各スポット内で得られるスペクトルの差異からその部位に特有のバイオマーカーを探索することを目的とする。イメージングモードでは、組織切片上にマトリックスを均一に噴霧し、必要な解像度で連続的に測定を行い、結果を2次元に可視化することを目的としている。

### A-4. ナノ粒子の体内動態可視化と本研究の目的

21世紀高齢社会における健康福祉増進、クオリティ・オブ・ライフ実現のためには、ナノテクノロジーの貢献が不可欠である。とりわけ、ドラッグデリバリーシステム(DDS)や癌治療である磁性粒子温熱療法(ハイパーサーミア)をはじめとするナノマテリアルの人体へのバイオ応用には、あらかじめ起こり得る生体反応と条件を周到に把握する必要がある。一方で、ナノテクノロジーの発展による金属ナノ粒子や、フラーレン、カーボンナノチューブをはじめとするナノカーボン材料の高機能性と共に為害性も増進する可能性が挙げられている。その安全性を確認する上で必須の体内挙動を解明するために、本研究班では以下の研究を行う。

#### (i). フラーレンの体内動態可視化

ナノテクノロジー分野において、C<sub>60</sub>はその生理活性機能が期待され、様々な研究が行われている。XSAM、SEM-EDX、EPMAなどの測定装置では、炭素で構成されているフラーレン(C<sub>60</sub>)を有機化合物である生体内で検出することは不可能である。したがって、放射性元素によるラベルリングすることで生体内代謝機能が調べられているが、放射性元素を扱うには設備が必要であり、容易な実験ではない。フラーレンは非常に安定な構造(sp<sup>2</sup>構造)を有することが知られており、また化学修飾を行うことによって水溶化も可能である。修飾部位はsp<sup>3</sup>結合になるため、容易に解離することが予測される。つまり質量分析においても、水溶化フラーレンのようなフラーレン誘導体はイオン化の段階で解離を起こし、もとの完全な状態を観測することはできない。解離して修飾部位の外れたフラーレンとその開裂イオンのみが観測されることがすでに実証されている。そこで、選択的標識を有したフラーレン誘導体を用いることによる、間接的モニタリングの実現を図る。つまり、目的のマーカーに選択的に結合するような

水溶化フラレンを設計して生体組織に導入すると、マーカー部分だけにフラレン誘導体が結合する。マーカーが存在した部分のみからイオン化が起り、解離イオンであるフラレンを測定することにより、生体内のどの部位に濃縮しているのかイメージングを行う (図5)。

### (ii). バイオ用ナノ粒子の作製

本研究課題に必要である様々な種類の金属、および形状を持つ金属ナノ粒子の合成、及び親水性カーボンナノチューブの調製を行う。

### (iii). 炎症性バイオマーカーの可視化

現在、ナノ粒子凝集体、インプラント材料などによる炎症反応は、光学顕微鏡などによる組織学的観察による専門的な知識と経験が必要不可欠である。炎症性の低い材料などによる炎症性や早期炎症性においては、素人の研究者では光学顕微鏡写真で炎症性度合いを判断することが困難である。そこで、質量分析によって炎症におけるバイオマーカーを探索し、イメージングすることで炎症度合いの可視化を試みる。

本年度は、イメージング質量分析によりフラレンの体内動態可視化を試み、フラレンの生体内での代謝分布評価法としての予備実験を報告する。

## B. 研究方法

試料の水溶化フラレンには、高速液体クロマトグラフィーによって分離・精製されたグルコース二量体  $\text{Glc}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$ 、ガラクトース二量体  $\text{Gla}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$ 、および水溶化フラレン  $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  を使用した。

MALDI-TOF-MS には、ビーム径が約 60  $\mu\text{m}$  に設定された窒素レーザー (337 nm) を装備した ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) を使用した。測定モードは、Positive および Negative Linear mode とした。試料プレートには、MTP Slide-Adapter (#221499 Bruker Daltonics) を使用した。

予備実験として Nitrocellulose Membrane (BioRad, 162-0116, ポア径 0.45  $\mu\text{m}$ ) を、組織を使用した実験では、ウイスターラットの肝臓を取り出し、高濃度の水溶化フラレン、糖鎖水溶化フラレンを注入後、切片化したものも準備した。

## C. 結果と考察

### C-1. Nitrocellulose Membrane 上における水溶化フラレンのイメージング質量分析マッピング

はじめに生体組織の状態に近い条件を作り出すために、通常はウエスタンブロッティング等に用いられている Nitrocellulose Membrane を利用し、そこに水溶化フラレンをしみこませることとした。そして水溶化フラレンから解離して得られるフラレンイオン ( $720\text{ m/z}$ ) をイメージングによりモニタリングすることを試みた。図6に糖鎖水溶化フラレンであるグルコース二量体  $\text{Glc}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$ 、ガラクトース二量体  $\text{Gla}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$  の Neg. Linear mode でのイメージング測定の結果を示す。Nitrocellulose Membrane は導電性のスライドガラス上に、導電性の両面テープで貼り付けられている。イメージング測定は試料が存在している部分を含む領域を選択して行った。解離イオンとして得られた  $\text{C}_{60}$  のイメージング結果を、 $720 \pm 5\text{ Da}$  の範囲で赤色に表示させている。図6b)、d) に見られるように、メンブレン上の水溶化フラレンを染み込ませた部分のみに、解離イオンである  $\text{C}_{60}$  が観測されていることがわかる。また、図6a)、c) の写真では、水溶化フラレンを染み込ませた部分には濃淡があり、外周部分に多くの試料が存在している様子が見られる。イメージングの結果にも同様に、外周部付近に解離イオンである  $\text{C}_{60}$  が多く存在している様子が表れており、このような分布の状態がイメージングに的確に再現されていることがわかる。すなわち解離イオンである  $\text{C}_{60}$  は、水溶化フラレンとしての存在を反映した形で検出できることがわかり、実践での応用に期待がもてる。

### C-2. ラットの肝臓組織を使用した水溶化フラレンのイメージング質量分析マッピング

ラットの肝臓組織切片を使用した水溶化フラレン  $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  のモニタリングの検討結果を図7に示す。図7a) は、水溶化フラレン  $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  を注入した肝臓組織の切片写真であり、測定は試料が完全乾燥した状態で行っている。図7b) は  $720\text{ m/z}$  のイメージング像である。この  $720\text{ m/z}$  の質量は collision induced dissociation による解離方法 (MS/MS) を使用した解離パターンを測定したところ、 $\text{C}_{60}$  由来の  $\text{C}_2$  ロスシリーズおよび  $\text{C}_1$  ロスシリーズが認められた。このことから、確かに  $720\text{ m/z}$  がフラレンであり、この図から示されるように、組織切片に添加した水溶性

フラーレン  $C_{60}(OH)_n$  からの解離イオンである  $C_{60}$  を検出することに成功し、間接的なモニタリングシステムの有効性が明らかになった。

図8にラットの肝臓組織切片を使用した糖鎖水溶化フラーレンのモニタリングの検討結果を示す。図8a)、8b) はグルコース二量体水溶化フラーレン  $Glc_2-C_{60}(OH)_n$ 、ガラクトース二量体水溶化フラーレン  $Gla_2-C_{60}(OH)_n$  を注入した肝臓組織の切片写真であり、図8c)、8d) はそれぞれの720 m/z のイメージング像である。どちらの肝臓組織切片にも添加した糖鎖付加水溶化フラーレンからの解離イオンである  $C_{60}$  を検出することに成功している。また、分子量1000~20000 Da の範囲でイメージングを行った場合、イメージング像が全く見られなかったことから、組織由来のタンパク質等の物質はイオン化していないことがわかる。これはマトリックスを使用していないために、フラーレン以外の物質がイオン化できないためである。図9はグルコース二量体水溶化フラーレン  $Glc_2-C_{60}(OH)_n$  を注入した肝臓組織の720 m/z のイメージング像の拡大図である。丸で囲っている部分にグルコース二量体水溶化フラーレンが存在した場所であるが、組織内で凝集している可能性がある。これは、ラットから切除した肝臓に水溶化フラーレン、糖鎖付加水溶化フラーレンを直接注入したものであるため、局所的な凝集効果によるものとする。今後、*in vivo* での水溶化フラーレンの静脈注射による血液流動投与により、水溶化フラーレンが蓄積された臓器の組織切片をイメージング質量分析測定することにより、水溶化フラーレンの代謝分布を詳しく調べることができる。と考える。

#### D. 結論

本年度は、イメージング質量分析によりフラーレンの体内動態可視化を試み、フラーレンの生体内での代謝分布評価法としての予備実験を行った。組織切片に添加した水溶性フラーレン ( $C_{60}(OH)_n$ )、糖鎖付加水溶化フラーレン (グルコース二量体  $Glc_2-C_{60}(OH)_n$ 、ガラクトース二量体  $Gla_2-C_{60}(OH)_n$ ) からの解離イオンである  $C_{60}$  を検出することに成功し、間接的なモニタリングシステムの有効性が明らかになった。今回開発した選択的標識を有する水溶性フラーレン誘導体の間接的モニタリングシステムは、その感度と選択性において非常に優れているも

のであるという知見を得た。

#### E. 文献

- 1) J. R. Yates III et al, *Anal. Biochem.*, 1993, **214**, 397.
- 2) A. Shevchenko et al, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 850.
- 3) D. J. C. Pappin et al, *Curr. Biol.*, 1993, **3**, 327.
- 4) M. Mann et al, *Biol. Mass Spectrom.*, 1993, **22**, 338.
- 5) P. James et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **1**, 58.
- 6) W. J. Henzel et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, **90**, 5011.
- 7) D. F. Hochstrasser, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1998, **36**, 825.
- 8) M. J. Page et al, *Drug Discovery Today*, 1999, **4**, 55.
- 9) W. P. Blackstock, M. P. Weir, *TIBTECH*, 1999, **17**, 121.
- 10) C. D. O'Connor et al, *Methods Microbiol.*, 1998, **27**, 191.
- 11) E. F. Petricoin et al, *Lancet*, 2002, **359**, 572.
- 12) J. D. Wulfkühle et al, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**, 267.
- 13) J. Villanueva et al, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1560.
- 14) M. Merchant et al, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 1164.
- 15) D. F. Ransohoff, *J. Natl. Cancer Inst*, 2005, **97**, 315.
- 16) R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 4751.
- 17) J. Pierson et al, *J. Proteome Res.*, 2004, **3**, 289.
- 18) S. A. Schwartz et al, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 981.
- 19) K. Yanagisawa et al, *Lancet.*, 2003, **362**, 433.
- 20) P. Chaurand et al, *Proteomics*, 2001, **1**, 1320.
- 21) N. Masumori et al, *J. Cancer Res.*, 2001, **61**, 2239.
- 22) S. A. Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.*, 2003, **38**, 699.
- 23) J. L. Norris et al, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6642.
- 24) M. C. Galicia et al, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1891.



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Go Yamamoto, Yoshinori Sato, Toru Takahashi, Mamoru Omori, Akira Okubo, Kazuyuki Tohji, Toshiyuki Hashida, “Mechanical properties of binder-free single-walled carbon nanotube solids”, *Scripta Materialia*, **54**, 299-303 (2006).
- Naofumi Aoki, Atsuro Yokoyama, Yoshinobu Nodasaka, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, Fumio Watari, “Strikingly Extended Morphology of Cells Grown on Carbon Nanotubes”, *Chem. Lett.* **35**, 508-509 (2006).
- Mayuko Ushiro, Kanae Uno, Takashi Fujikawa, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, Fumio Watari, Wang-Jae Chun, Yuichiro Koike, Kiyotaka Asakura, “X-ray absorption fine structure (XAFS) analyses of Ni species trapped in graphene sheet of carbon nanofibers”, *Phys. Rev. B* **73**, 144103 (2006).
- Go Yamamoto, Yoshinori Sato, Toru Takahashi, Mamoru Omori, Toshiyuki Hashida, Akira Okubo, Kazuyuki Tohji, “Single-walled carbon nanotube-derived novel structural material”, *J. Mater. Res.*, **21**, 1537-1542 (2006).
- Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, “Apatite formation on carbon nanotubes”, *Material science & Engineering C* **26**, 675-678 (2006).
- Yutaka Maeda, Yoshinori Sato, Masahiro Kako, Takatsugu Wakahara, Takeshi Akasaka, Jing Lu, Shigeru Nagase, Yumiko Kobori, Tadashi Hasegawa, Kenichi Motomiya, Kazuyuki Tohji, Atsuo Kasuya, Dan Wang, Dapeng Yu, Zhengxiang Gao, Rushan Han, Hengqiang Ye, “Preparation of Single-Walled Carbon Nanotubes-Organosilicon Hybrids and Their Enhanced Field Emission Properties”, *Chemistry of Materials* **18**, 4205-4208 (2006).
- Shin-ichi Ogino, Yoshinori Sato, Go Yamamoto, Kenichiro Sasamori, Hisamichi Kimura, Toshiyuki Hashida, Kenichi Motomiya, Balachandran Jeyadevan, Kazuyuki Tohji, “Relation of the Number of Cross-Links and Mechanical Properties of Multi-Walled Carbon Nanotube Films Formed by a Dehydration Condensation Reaction”, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 23159-23163 (2006).
- D. Kodama, K. Shinoda, K. Sato, Y. Sato, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Synthesis of Fe-Co alloy particles by modified polyol process”, *IEEE Trans. Magn.*, **42**, 2796-2798 (2006).
- B. Jeyadevan, K. Shinoda, R. J. Justin, T. Matsumoto, K. Sato, Y. Sato, K. Tohji, “Polyol process for Fe-based hard (fct-FePt) and soft (FeCo) magnetic nanoparticles”, *IEEE Trans. Magn.*, **42**, 3030-3035 (2006).
- D. Kodama, K. Shinoda, K. Sato, K. Sato, Y. Konno, R. J. Joseyphus, K. Motomiya, H. Takahashi, T. Matsumoto, Y. Sato, K. Tohji, B. Jeyadevan, “Chemical Synthesis of Sub-micrometer- to Nanometer-Sized Magnetic FeCo Dice”, *Adv. Mater.*, **18**, 3154-3159 (2006).
- 石黒三岐雄, 佐藤義倫, 田路和幸, 我妻和明, “高周波誘導結合プラズマ発行情分分析法によるカーボンナノチューブ中の金属元素の定量”, *分析化学*, **55**, 117-120 (2006).
- 佐藤義倫, 宇尾基弘, 横山敦郎, 柴田健一郎, 亘理文夫, 田路和幸, “カーボンナノチューブと金属内包カーボンナノカプセルの毒性評価”, *表面*, **44**, 87-103 (2006).
- 田路和幸, 佐藤義倫, “生体組織反応性に及ぼすカーボンナノチューブの純度と形態の影響”, *バイオマテリアル 一生体材料*, **24**, 333-344 (2006).
- 渥美 崇, バラチャンドラン ジャヤデワン, 佐藤義倫, 田路和幸, “磁性粒子を発熱体とした温熱療法の基礎的検討 その1 一温熱療法に適した磁性粒子の理論および実験的検討一”, *日本応用磁気学会誌*, **30**, 555-560 (2006).
- 佐藤義倫, 横山敦郎, 柴田健一郎, 亘理文夫, 田路和幸, “カーボンナノチューブの安全性”, *炭素*, **225**, 364-372 (2006).
- 佐藤義倫, “カーボンナノチューブの毒性評価”, *カーボンナノチューブの機能・複合化の最新技術*, CMC 出版 (2006).

### 2. 学会発表

- Yoshinori Sato, Genta Sato, Kazuyuki Tohji, Rikizo Hatakeyama, “Control of an arc peripheral reactive plasma growing radial single-walled carbon nanotubes”, *The 6th International Conference on Reactive Plasmas and 23rd*

- Symposium on Plasma Processing*, Scientific Program P27, Matsushima, Miyagi, Japan, 2006. 1. 25.
2. **Yoshinori Sato**, Takuya Uchida, Naofumi Aoki, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Atsuro Watari and **Kazuyuki Tohji**, "Cell proliferation of osteoblasts on carbon nanotubes with different diameter", 7th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, Abstract P194, Nagano, Japan, 2006. 6.20.
  3. **Y. Sato**, A. Yokoyama, **K. Tohji**, "Preparation of Size Controlled Hat-Stacked Carbon Nanofibers, and Their Cytotoxicity in Rat", 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, P56, Sendai, Japan, 2006.11.7.
  4. **佐藤義倫**, "Cytotoxicity of Carbon Nanotubes ーカーボンナノチューブの細胞毒性ー", 2006 年度炭素学会 2 月セミナー ナノカーボンの未来を探る ー用途開発の最先端と生体への影響評価ー, 東京都、文京区 2006. 2. 3.
  5. **佐藤義倫**, **田路和幸**, 菫澤 崇, "イメージング質量分析を用いた生体組織評価 (1)", 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」、第 1 回研究発表会要旨集、P9-14 北海道、支笏湖 2006. 5. 16.
  6. **佐藤義倫**, 内田拓哉、土屋直実、青木尚史、赤坂 司、宇尾基弘、本宮憲一、B. ジャヤデワン、亘理文夫、**田路和幸**, "異なる直径を持つ多層カーボンナノチューブスキャホールド上の骨芽細胞の増殖", 第 31 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集、P112、三重県、津市 2005. 7. 12.
  7. **佐藤義倫**, "カーボンナノチューブ・名のカーボン材料における体内挙動。毒性評価の最新研究動向", セミナー番号 608203、技術情報協会、東京都、品川区 2006. 8. 21.
  8. **佐藤義倫**, "カーボンナノチューブの体内挙動", セミナー番号 611494、技術情報協会、東京都、品川区 2006. 11. 24
  9. **佐藤義倫**, **田路和幸**, "カーボンナノチューブの細胞毒性に関する純度と形態の影響", 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、P70 東京都、千代田区 2006. 11. 28.
  10. **佐藤義倫**, "カーボンナノチューブの毒性に関する理解はどこまで進んだか", 平成 18 年度 第 4 回 カーボンナノ材料研究会、大阪市、北区 2007. 2. 2.
  11. **佐藤義倫**, 土屋直実、青木尚史、横山敦郎、亘理文夫、**田路和幸**, "多層カーボンナノチューブスカフォールドにおける骨芽細胞増殖因子の探索", 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」、第 2 回研究発表会要旨集、P11 徳島県、鳴門市 2007. 3. 1.
  12. **佐藤義倫**, **田路和幸**, 菫澤 崇 "イメージング質量分析を用いた生体組織評価 (2)", 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」、第 2 回研究発表会要旨集、P65 徳島県、鳴門市 2007. 3. 1.

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
「無し」
2. 実用新案取得  
「無し」

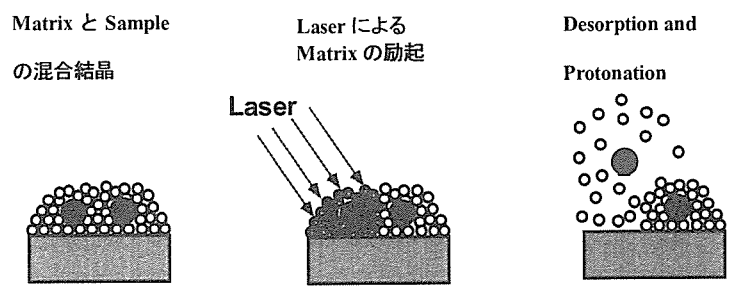


図 1 MALDI の概略図.

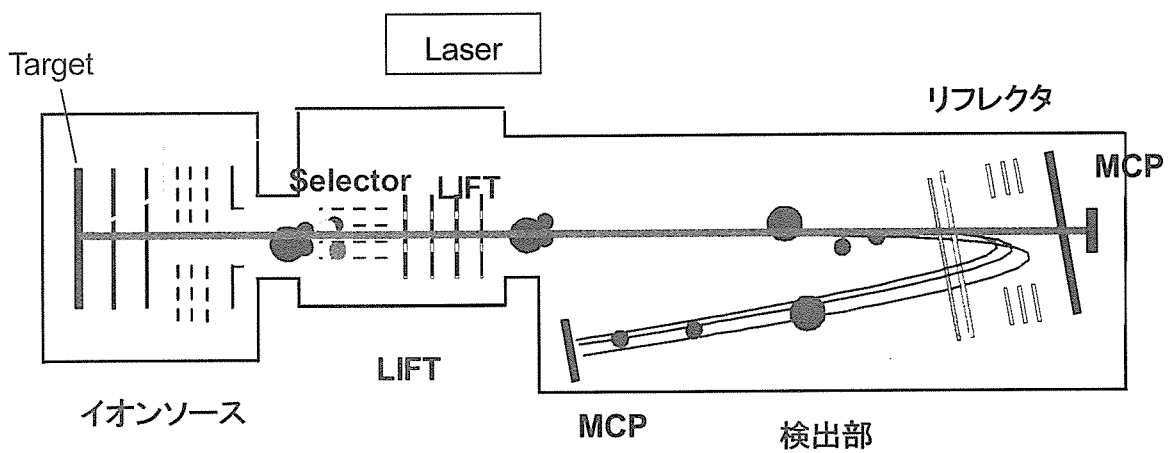


図 2 TOF-MS の概略図.

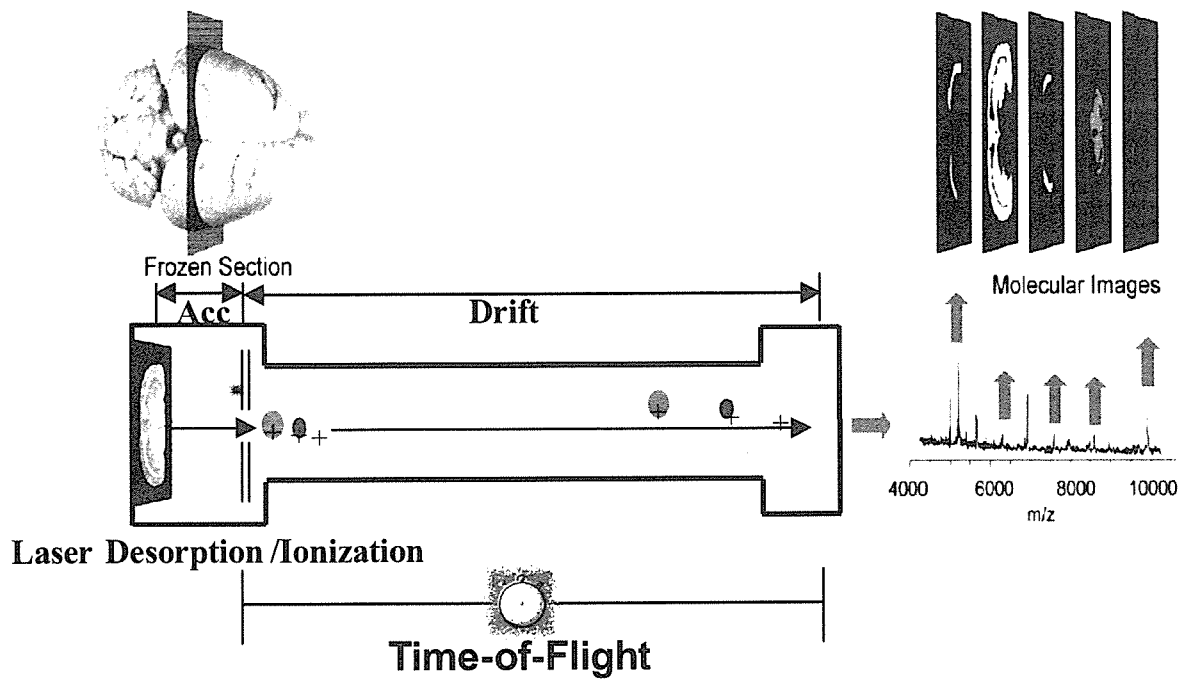


図3 イメージング質量分析の概念図.

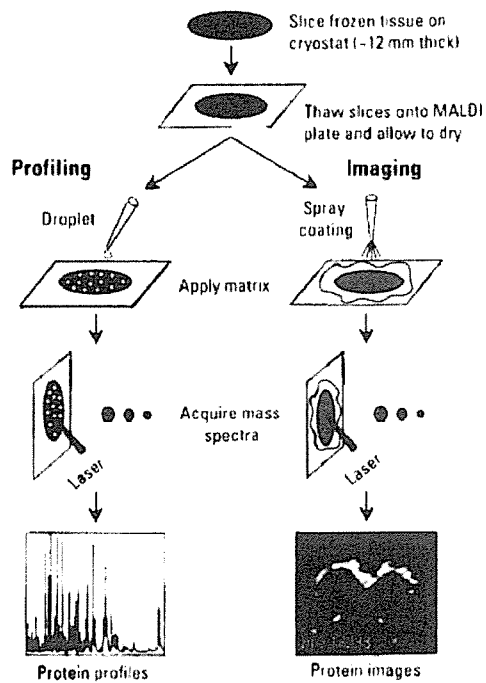


図4 イメージング質量分析の測定モード.

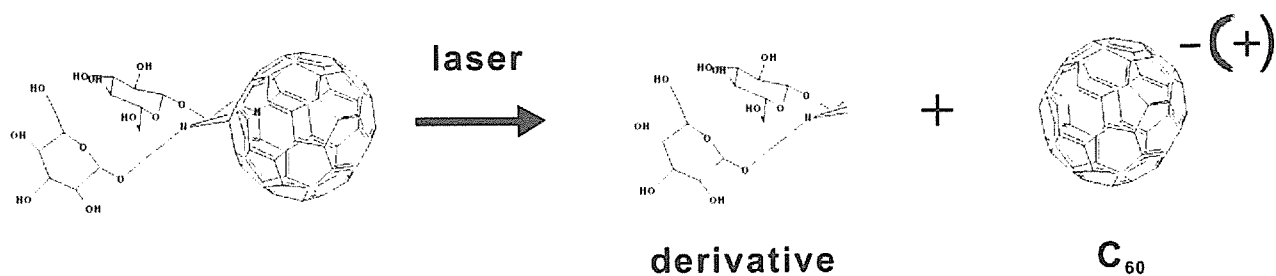


図5 水溶化フラーレンの解離モデル.

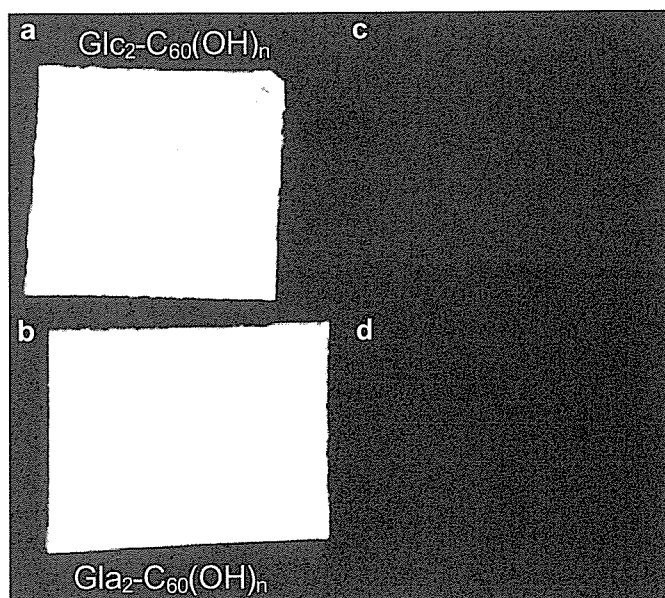


図6 Nitrocellulose membrane 上の糖鎖水溶化フラーレンのイメージング像.

a) Nitrocellulose membrane 上の  $\text{Glc}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$  の写真. b)  $\text{Glc}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$  の 720 Da でのイメージング像 (陰イオンモードの測定). c) Nitrocellulose membrane 上の  $\text{Gal}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$  の写真. d)  $\text{Gal}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$  の 720 Da でのイメージング像 (陰イオンモードの測定).

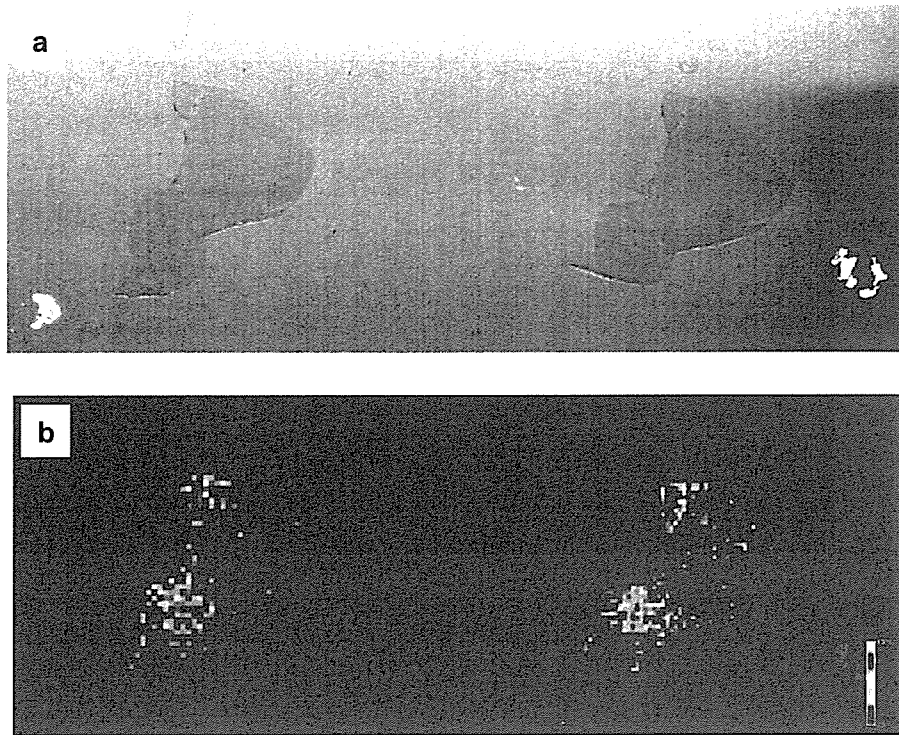


図 7 ラット肝臓組織上の水溶化フラーレンのイメージング像.  
 a)ラット肝臓組織切片. b)質量 720 で表示したイメージング像.

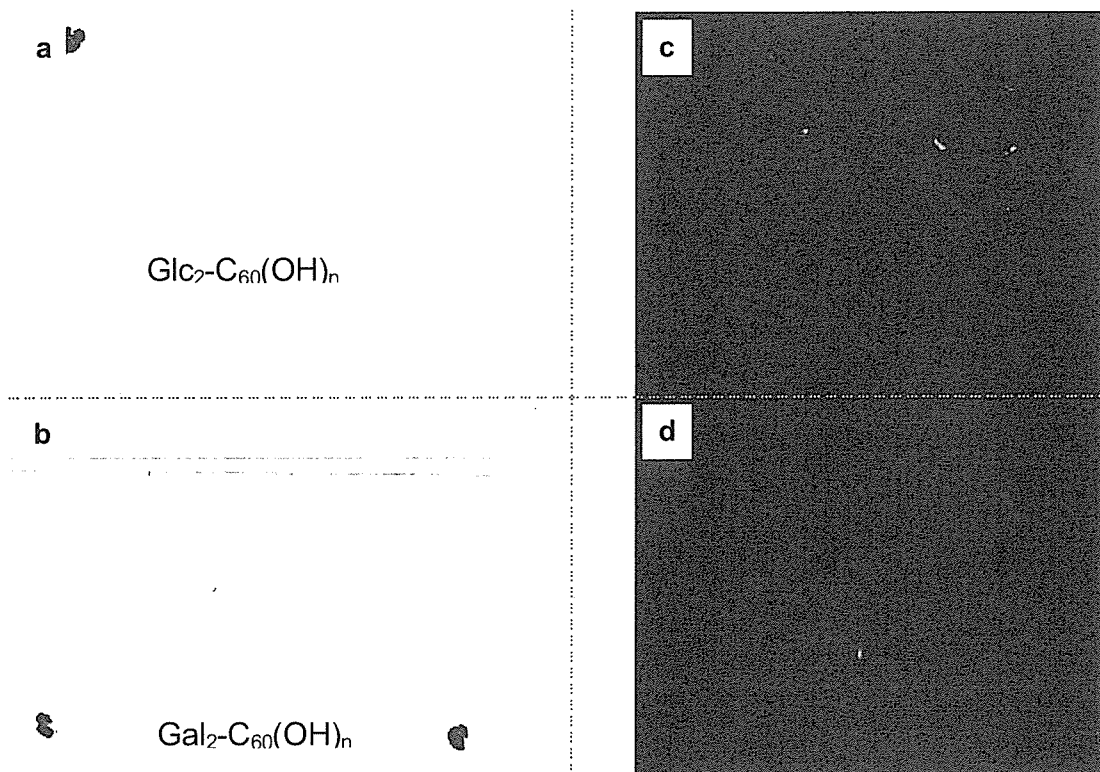


図 8 ラット肝臓組織上の糖鎖水溶化フラーレンのイメージング像.  
 a)Glc-C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub> を注入したラット肝臓組織切片. b)Gal-C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub> を注入したラット肝臓組織切片.  
 c)Glc-C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub> を注入したラット肝臓組織切片を質量 720 で表示したイメージング像. d)  
 Gal-C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub> を注入したラット肝臓組織切片を質量 720 で表示したイメージング像.

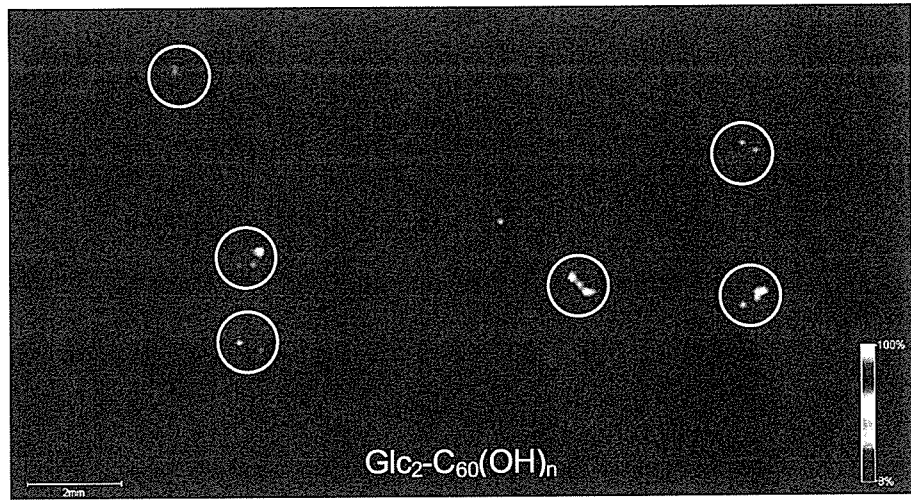


図 9 ラット肝臓組織上の  $\text{Glc-C}_{60}(\text{OH})_n$  水溶化フラーレンの質量 720 で表示したイメージング像.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

カーボンナノ物質に対する生体反応  
－生体材料への応用と生体内分布－

分担研究者	横山敦郎	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	青木尚文	北海道大学歯学研究科大学院生
研究協力者	山本 悟	北海道大学歯学研究科助手
研究協力者	野田坂佳伸	北海道大学歯学研究科助手
研究協力者	向後隆男	北海道大学歯学研究科特命教授
研究協力者	坂口紀史	北海道大学エネルギー変換マテリアル 研究センター助教授
研究協力者	葦澤 崇	ブルカー・ダルトニクス株式会社

**研究要旨** 本研究において、我々は、カーボンナノチューブ(CNTs)をはじめとするカーボンナノ物質を生体材料に応用することを目的に、カーボンナノ物質の安全性の検討および細胞培養用スキャホールドの開発を行った。安全性の検討として、各種カーボンナノ物質の皮下組織への長期埋入試験とフラレン注入時の体内分布を検索するための予備実験を行い、細胞培養用スキャホールドの開発としては、カーボンナノ物質のポリカーボネート膜への固着によるスキャホールドの作製および骨芽細胞培養試験を行った。安全性の検討の結果、カーボンナノ物質は皮下埋入において強い炎症反応を惹起しないこと、その反応は物質の構造および大きさに影響されること、フラレンの体内での分布をマッピングすることが可能であることが明らかとなった。また、CNTsを固着したスキャホールドは、細胞増殖、形態計測、酵素活性試験の結果から、骨芽細胞の培養に有効であることが示唆された。以上の結果から、カーボンナノ物質の生体材料としての大きな可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

超高齢化社会が到来しつつある現在、医療費の増加は不可避の問題である。社会保険制度の見直しも重要な問題であるが、遺伝子治療や再生医療など新しい技術・材料による新しい治療法の開発も急務の一つである。特に、新たな戦略による生体材料の開発は医学のみならず広く科学の発展に寄与するばかりでなく、周辺産業の育成にも大きく寄与することが期待される。

一方、工業的に非常に優れた材料としてこれまで

に多くの建築物や民生品に使用されてきたアスベストによる中皮腫等の問題が、最近報道されるようになり、材料の生体に対する安全性が大きな社会問題になっている。

我々は、このような状況を鑑み、物理的、化学的、電気的特性から多くの分野で基礎的な研究がなされているカーボンナノ物質をバイオ領域に応用すること、特にカーボンナノ物質を応用した生体材料の開発を目的に数年来研究を行っている。

本研究においては、アスベストが生体内に取り込



まれた後十数年以上経過して多くの問題を惹起したことを考慮し、長期間埋入時のカーボンナノ物質の生体反応および代表的なカーボンナノ物質であるフラーレンの注射後の生体内分布を明らかにすることを目的に *in vivo* の実験を行った。さらに、カーボンナノ物質を細胞培養用スキャホールドに応用することを目的に、各種カーボンナノ物質を用いてスキャホールドを作製し、骨芽細胞様細胞を用いて *in vitro* の実験を行った。

## B. 研究方法

### 1. カーボンナノ物質のラット皮下への埋入試験

#### 1) 材料

##### (1) 多層カーボンナノチューブ (MWCNTs)

Nano Lab 社製 MWCNTs の触媒を除去するため、塩酸および水酸化ナトリウムで洗浄後、95%硫酸と60%硝酸を 3:1 で混合した溶液中で5時間超音波処理を行い、MWCNTs を精製した。得られた MWCNTs の長さを制御するため、エタノール中で1時間超音波処理し、ポリカーボネート製の直径 2.0, 1.2, 0.8 および 0.4 ミクロンの濾過膜で濾過し、平均長さ 220nm および 825nm の MWCNTs を得た (以下 220MWCNTs および 825MWCNTs とする)。 (図1)

##### (2) ハット積層型カーボンナノファイバー

(Hat-Stacked Carbon Nanofibers:H-CNFs)化学蒸着法により合成し、酸処理にて触媒金属である Ni を除去し、H-CNFs を得た。長さを制御するため、H-CNFs を 95%硫酸と 60%硝酸を 3:1 で混合した溶液中で4時間超音波処理を行い、洗浄、濾過後、さらにエタノール中で1時間超音波処理を行い、直径 2, 1.2 および 0.4 ミクロンの濾過膜で順に濾過し、平均長さ 590nm と 1160nm の H-CNFs を得た (以下 600H-CNFs および 1200H-CNFs とする)。 (図2)

#### 2) 実験方法

6 週齢雄性ウィスター系ラットを実験動物として用いた。Pentobarbital Sodium の腹腔内注射による全身麻酔を行った後、腹部に切開を加え皮下にポケットを形成し、粉状の H-CNFs および MWCNTs を埋入し、縫合した。埋入後、1, 4, 16 週および 1 年後に Pentobarbital Sodium による全身麻酔後、灌流固定を行い周囲組織とともに摘出した。摘出した組織を、浸漬固定後 2 分割し、一方は、パラフィンに包埋し、

5 ミクロンの厚さで薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡で観察した。もう一方は、Epon812 に包埋し、厚さ約 80nm で薄切し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛にて二重染色後、電子顕微鏡で観察した。

### 2. フラーレンの生体内分布の検索

#### 1) 材料

##### 糖鎖結合型水溶化フラーレンの調整

体内、特に肝臓におけるフラーレンの分布を検索するため、ガラクトースを結合したフラーレンを作製後、水酸基を多数導入し、水溶化フラーレンを調整した。

#### 2) 実験方法

6 週齢雄性ウィスター系ラットを実験動物として用いた。エーテル吸入にて屠殺後、肝臓を摘出し、約 5mm 角に切り出した後、各種水溶化フラーレンを 1ml 注入した。液体窒素にて凍結後、凍結切片を作製し、凍結乾燥後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) により、フラーレンを検出した。

### 3. カーボンナノ物質の細胞培養用スキャホールドへの応用

#### 1) 材料

##### (1) MWCNTs

直径 5–20nm、長さ 20–40 $\mu$ m の Nano Lab 社製 MWCNTs (純度 98.17%) を、塩酸により触媒を除去し、実験に用いた。

##### (2) 単層カーボンナノチューブ (SWCNTs)

直径 1.3–1.5nm、長さ 2–3 $\mu$ m の Nano Lab 社製 SWCNTs (純度 99.56%) を、塩酸により触媒を除去し、実験に用いた。

##### (3) グラファイト (GP)

直径 4.5 $\mu$ m のグラファイト粒子を実験に用いた。

#### 2) 実験方法

##### (1) 細胞培養用スキャホールドの作製

MWCNTs, SWCNTs および GP 各 200 $\mu$ g を 100ml の脱イオン水に、分散させ 15 分超音波処理を行った。その後、分散液を直径 47mm、孔径 0.8 $\mu$ m の PC 膜を用いて吸引ろ過し、PC 膜を 60 $^{\circ}$ C、30 分乾燥し、MWCNTs, SWCNTs および GP を PC 膜に固着し、スキャホールドを作製した。 (図3)

##### (2) タンパク吸着試験

各スキャホールドを、10%FBS を含む DMEM 培

地 (2ml) に 37°C, 24 時間浸漬した. スキャホールドを PBS で 3 回洗浄した後, 15 分間超音波処理を行い, 1200rpm で 3 分間遠心し, 上澄を回収し, BCA 法でタンパク量を計測した.

### (3) 細胞培養

各種スキャホールドを 6cm ディッシュに固定し, ヒト骨肉種由来の骨芽細胞様細胞である SaOS2 を  $1 \times 10^5$  個播種し, 10%FBS および抗生剤を含む DMEM 培地で, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 気相下で 3 日および 7 日培養した.

### (4) 細胞増殖試験

各スキャホールドの細胞の増殖に対する影響を検索するため, 上記の培養条件で 3 および 7 日間培養し, SEM 写真を撮影し, 任意の 10 領域の細胞数を測定した.

### (5) アルカリフォスファターゼ活性

各スキャホールドの骨芽細胞の機能に対する影響を検索するため, 3 および 7 日間培養後のアルカリフォスファターゼ活性を測定した.

### (6) 検定方法

タンパク吸着, 細胞数, アルカリフォスファターゼ活性の測定結果については, Mann-Whitney U 検定にて, 有意差検定を行った.

### (倫理面への配慮)

本研究の動物実験は, 北海道大学歯学部動物実験委員会の承認を得て, 北海道大学歯学部動物実験に関する指針に基づき行った.

## C. 研究結果

### 1. カーボンナノ物質のラット皮下への埋入試験

#### 1) MWCNTs について

##### (1)220MWCNTs :

埋入 1 週間においては, 220MWCNTs の多くは, マクロファージや線維芽細胞内に観察され, 大きな集塊周囲には異物巨細胞が観察されたが(図 4-1), 強い炎症反応は観察されなかった. TEM 観察において, 220MWCNTs の多くは, マクロファージ中のライソゾーム内に観察された(図 4-2). 220MWCNTs は凝集していたが, 特有なチューブ状の形態には変化は認められなかった.

16 週においては, 220MWCNTs はマクロファ-

ージやコラーゲン線維間の線維芽細胞中に観察された. 比較的大きな集塊の周囲には異物巨細胞が観察されたが, 強い炎症反応は認められなかった(図 4-3). TEM 観察においては, 1, 4 週同様に CNT は, マクロファージや線維芽細胞内のライソゾーム中に観察された. その多くは凝集しており, チューブ状の形態に変化は認められなかった(図 4-4). また, コラーゲン線維間に凝集した CNT の集塊が観察された(図 4-5).

1 年後においては, 220MWCNTs は, 脂肪組織内に観察された. 小さな 220MWCNTs の集塊は, マクロファージに貪食されていたが, 大きな集塊の周囲にはマクロファージや異物巨細胞が観察され, 軽度ではあるが, いわゆる肉芽腫性炎を呈していた(図 4-6). TEM 像においては, マクロファージ内のほとんどの 220MWCNTs は, ライソゾーム内に観察され, そのチューブ状の特有な構造には変化が見られなかった(図 4-7).

##### (2)825MWCNTs について

埋入 1 週後, 825MWCNTs 周囲には軽度な炎症反応を伴う肉芽組織が観察された. 220MWCNTs に比較すると炎症反応はやや強い傾向を示した(図 4-8). 825MWCNTs の一部は, マクロファージに貪食されていた. TEM では, 細胞間の一部に 825MWCNTs が観察されたが(図 4-9), マクロファージの細胞質内に凝集した CNTs が認められ, 膜構造で覆われていないものが多かった(図 4-10).

埋入 16 週後では, 825MWCNTs 周囲には, マクロファージや異物巨細胞に認められ, マクロファージや線維芽細胞内に貪食されている像も観察された(図 4-11). 一部の 825MWCNTs 周囲に異物巨細胞が多数認められ, 肉芽腫性炎を呈していた(図 4-12). TEM においては, ライソゾームに存在する 825MWCNTs も認められるようになったが, その構造に変化は観察されなかった(図 4-13, 14).

1 年後においては, 825MWCNTs は, 脂肪組織内に観察された. 軽度な肉芽腫性炎を呈しており, MWCNTs の大きな集塊が, 220MWCNTs に比較し多く観察された. 16 週までは, 220MWCNTs より炎症反応は強い傾向を示したが, 1 年後においては, 差は認められなかった(図 4-15). TEM 観察においては, チューブ状の構造には変化が見られなかったが, 凝集の程度は弱くなる傾向が認められ, 1

本1本のMWCNTsの構造が明確に観察された(図4-16).

## 2) H-CNFsについて

(1)600H-CNFs: 埋入1週間においては, 大きな集塊のH-CNFsは, 線維性結合組織に被包されていたが, H-CNFsの多くはマクロファージや線維芽細胞に貪食されていた. 肉芽組織はほとんど観察されず, 炎症は軽微であった(図5-1). TEM観察においては, 多くのH-CNFsは, 細胞質内で円形に集合しており, ライソゾーム内にもH-CNFsが観察された(図5-2). 16週間では, H-CNFsを貪食したマクロファージの集積が観察されたが, 線維性結合組織の被膜はほとんど認められなかった. 血管内皮細胞, 線維芽細胞内およびコラーゲン線維に沈着しているCNFsも観察された. マクロファージや線維芽細胞内のCNFsは, 1週後に比較し小さな顆粒状の形態を示すものが多く認められた(図5-3). TEM観察においては, ほとんどのH-CNFsは, ライソゾーム中に認められた. ライソゾーム中のH-CNFsは, 長さが短くなっているものやその特有の構造の変化が示唆されるものも観察された(図5-4).

埋入1年後において, H-CNFsは, 脂肪組織内に観察された. 16週と同様に, 小さなH-CNFsの集塊は, マクロファージ等の貪食細胞内に観察されたが, 大きな集塊は薄い線維性結合組織に被包されていた(図5-5). TEM観察においては, 長さの短いH-CNFsや特徴である傘が積層された結晶構造の変化を示唆する像がライソゾーム中に認められた(図5-6).

(2)1200H-CNFs: 1週間においては, 600H-CNFsと同様にマクロファージや線維芽細胞に貪食されているものが多数認められたが, 貪食されていないものが600H-CNFsに比較し多く観察された(図5-7). 炎症は軽微であるが, 600H-CNFsに比較しやや強い傾向を示した. TEM観察では, 細胞質内に1200-CNFsが多数観察されたが, ライソゾーム内には認められなかった(図5-8). 16週間においては, 600H-CNFsとほぼ同様の所見を呈し, マクロファージや線維芽細胞内に小さく顆粒状になった1200H-CNFsが観察された(図5-9). TEM観察では, 細胞質内に円形に集合している1200H-CNFsが多数認められ, 一部のものはライソゾーム内に存在し, 600H-CNFsと同様に, 短縮や結晶構造の変化が

観察された(図5-10).

1年後においては, H-CNFsは脂肪組織中に観察された. 600H-CNFsとほぼ同様な組織像を示し, 埋入初期に観察された材料の長さによる炎症反応の強さの差は認められなかった(図5-11). TEM観察においては, 特有な結晶構造である積層された傘が分離し, 短縮を示唆する像が認められた(図5-12).

## 2. フラーレンの生体内分布の検索

MALDI-TOF-MSの結果を図に示す. 今回の検索では, 糖鎖をつけていないフルーレンが最も明確に検出され, 肝臓における局在が明確に示された(図6-1, 2, 3).

## 3. カーボンナノ物質の細胞培養用スキャホールドへの応用

### 1) 細胞培養用スキャホールドの作製

いずれのカーボンナノ物質もPC膜に十分に固着され, 培地中で剥離することはなかった.

### 2) タンパク吸着試験

図7-1にタンパク吸着試験の結果を示す. SWCNTsが最も高い値を示し, 以下MWCNTs, PC, GPの順であった.

### 3) 細胞増殖試験

培養3日後および7日後の各スキャホールド上の形態を図7-2に, 細胞数を, 図7-3に示す. 3, 7日後とも, PCに比較しCNTsは細胞数が有意に多く, また7日後では, SWCNTsのほうがMWCNTsに比較し有意に多い値を示した.

### 4) アルカリフォスファターゼ活性

培養3日後および7日後のALP活性を図7-4および7-5に示す. スキャホールドあたりのALP活性, タンパク量あたりのALP活性ともに, PC, GPに比較しCNTsのほうが高い値を示した.

## D. 考察

### 1. カーボンナノ物質のラット皮下への埋入試験

本研究では, カーボンナノ物質の生体に与える影響について, *in vivo*の実験系を用いて検索した. さらに, カーボンナノ物質の構造とサイズが生体反応にどのような影響を与えるのかについても検討した.

MWCNTsの起炎性は, 埋入初期においては, サ

イズの大きいほうが起炎性は強く、埋入16週においても異物巨細胞が集積するいわゆる肉芽腫性炎が認められた。しかし、埋入1年後においては、サイズによる炎症の程度に差は認められなかった。サイズによる炎症程度の差には、MWCNTsの凝集が関係していると推察される。TEM所見から、220MWCNTsが1週後からライソゾーム内に認められるのに対し、825MWCNTsでは、細胞間に存在するものが多く、細胞内においても細胞質内で凝集して存在しているものが多いことから、長いMWCNTsのほうが、マクロファージで処理されにくいことが示唆された。これは、本研究グループの共同研究者である佐藤が報告しているように、長いMWCNTsの凝集性のほうが強く、さらに825MWCNTsは湾曲が強い形であり、凝集した状態から分離しにくいことなどに起因するものと推察された。16週においては、220MWCNTsに比較するとその数は少ないが、825MWCNTsにおいても一部にライソゾーム内にMWCNTsが観察された。さらに1年後においては、凝集の程度は弱くなり、MWCNTsの1本1本の構造が明瞭に観察されるものも認められた。MWCNTsは細胞質、ライソゾーム内でタンパクや酵素の影響を受け凝集程度が弱くなったものと考えられ、1年後825MWCNTsにおいても凝集が弱くなったことから、炎症の程度に差異が認められなくなったものと推察された。

MWCNTsでは、切断、短縮や結晶構造の変化は認められず、チューブ状の構造が埋入1年後においても維持されていた。これは、MWCNTsは炭素の六員環が連続している結晶構造をとるため、機械的強度が強だけでなく、化学的に安定であることも関係すると推察された。

H-CNFsについては、観察した期間中、変性や壊死などの強い炎症反応は認められず、埋入初期に軽微な炎症が認められるにすぎなかった。長さが異なる2種を試料として用いたが、長い1200H-CNFsの炎症反応のほうが、埋入初期においては600H-CNFsに比較し強い傾向を示したが、1年後においてはMWCNTsの場合と同様に差はほとんど観察されなかった。初期の炎症程度の差の原因として、1200H-CNFsのほうがマクロファージに貪食されにくいことが考えられる。これは、TEM所見からも裏付けられ、600H-CNFsは、埋入1週においてライソ

ゾーム中に認められるものがあり、多くのH-CNFsが、細胞質内において円形に集合していた。このことから、マクロファージ内でCNFsの処理が1週においてすでに進行していることが推察される。

1200H-CNFsにおいても、16週後においては、ライソゾーム内に多数のH-CNFsが観察され、経時的にマクロファージ内で1200H-CNFsの処理が進んでいることが示された。このため、埋入1年後といった長期においては、炎症程度には差が認められなかったと推察された。マクロファージ内でのH-CNFsの処理には、凝集しているH-CNFsの分散やH-CNFsの切断による短縮が関係するものと考えられる。ライソゾーム中に観察されるH-CNFsは、いずれの長さのH-CNFsであっても、400nm以下のものが多かった。短くなったものがライソゾームの中に入りやすいのか、あるいはライソゾーム内でH-CNFsが切断されるのかは明確ではないが、H-CNFsは、マクロファージ内で処理される可能性が示唆された。

H-CNFsは、傘状のグラフェンシートが積層された構造をしており、1枚1枚のグラフェンシートはファンデルワールス力で結合しているため、切断には大きなエネルギーを要しない。またグラフェンシートのエッジには、水酸基があり、細胞内の酵素やタンパクと容易に結合することが可能であり、いわゆるデラミネーションが起りやすいこともH-CNFsの切断に関係するものと考えられる。また、興味深い所見として、埋入16週および1年後でライソゾーム内において一部に、H-CNFsの特有の構造である積層された傘状の構造に変化が認められた。これは、グラフェンシートの結晶構造の変化と考えられるが、詳細については今後さらなる研究が必要と考えられる。

H-CNFsが細胞内で切断されたことは、DDSのキャリアとしての可能性を示唆するものであり、今後生理活性物質と複合などの研究が期待される。

起炎性については、MWCNTsのほうがH-CNFsに比較し強い傾向を示したが、このような構造の差に基づく細胞の反応が関係している可能性が示唆された。

また、埋入部位や濃度(量)などの条件も、生体反応に大きく関与するため、さらに、詳細かつ総合的な研究が必要であろう。

## 2. フラーレンの生体内分布の検索