

ーレンを設計して生体組織に導入し、マーカー部分だけにフラレン誘導体を結合させる。このサンプルを質量分析で測定すると、マーカー部分のみに存在するフラレン誘導体のイオン化が起こり、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フラレン誘導体が濃縮しているのかイメージングを行うことができるわけである(図1)。

本年度は、①水溶化フラレン ($C_{60}(OH)_n$) に含まれる NaCl の除去による精製と、②ラットに $C_{60}(OH)_n$ を注入してから、1 時間後と 24 時間後の臓器の切片をイメージング質量分析することにより、 $C_{60}(OH)_n$ の各臓器 (脳、肺、腎臓、肝臓) に対する可視化を行った。

B. 研究方法

B-3. $C_{60}(OH)_n$ の精製

$C_{60}(OH)_n$ の体内挙動を調べる際に、精製された $C_{60}(OH)_n$ が必要である。今回使用する $C_{60}(OH)_n$ は塩 (NaCl) が混入しているため、以下のような精製を行なった; $C_{60}(OH)_n$ 固形物を 10% のメタノール 2.0 mL に溶解させた。次に、平均細孔径 12.5 nm の直径 55~105 μm の C18 カラム充填材が充填されたオープンカラム (直径 30 mm) に 100% のメタノール、蒸留水をそれぞれ順番に流し、溶媒と充填材を馴染ませた後、10% メタノールに溶解した $C_{60}(OH)_n$ をカラムに投入し、塩の分離を行なった。しかし、塩濃度が高濃度であるため、 $C_{60}(OH)_n$ と塩は凝集した状態で、塩を分離することができなかった。そこで、イオン交換樹脂で塩を取り除いた後、オープンカラムで以下のような精製を行なった; $C_{60}(OH)_n$ 固形物 61.1 mg を 50 mL の蒸留水に溶解させる。さらに、H 置換型イオン交換樹脂 (AMBERLITE IR120B H AG, オルガノ株式会社) を 6.0 g 投入し、一晚攪拌させ Na を H に置換後、ろ過した。次に、得られたろ液に OH 置換型イオン交換樹脂 (AMBERLITE IRA410 OH AG, オルガノ株式会社) を 6.0 g 投入し、一晚攪拌させ Cl を OH に置換させた。置換後の溶液はロータリーエバポレーターで乾燥させ、10% メタノール 2.0 mL で溶解させた。その後、10% メタノールに溶解した $C_{60}(OH)_n$ を均細孔径 12.5 nm の直径 55-105 μm の C18 カラム充填材が充填されたオープンカラム (直径 30 mm) に投入し、塩の分離を行な

った。分離した溶液は、TOF-MS により $C_{60}(OH)_n$ の精製を評価した。

B-2. $C_{60}(OH)_n$ を注入したラットの 1 時間後の肝臓切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル

精製された $C_{60}(OH)_n$ をウイスターラットに注入し、1 時間後、24 時間後に各臓器 (脳、肺、肝臓、腎臓) 切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル組織を測定した。MALDI-TOF-MS には、ビーム径が約 60 μm 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。

C. 研究結果

C-1. $C_{60}(OH)_n$ の精製

オープンカラムのみで精製した $C_{60}(OH)_n$ の TOF-MS スペクトルでは、低質量側に検出される塩の質量ピーク強度が強く検出されている (図 2)。一方、イオン交換樹脂で処理したサンプルは、TOF-MS スペクトルの低質量側に検出される塩の質量が検出されていないことから、塩が除去されていることを確認した。しかし、イオン交換樹脂由来のピークが 300 m/z に検出され、 C_{60} ピーク強度が低いことから、イオン交換樹脂由来の不純物が混入し $C_{60}(OH)_n$ の純度が低下していることがわかる (図 3a)。図 3b はイオン交換樹脂処理、かつオープンカラム処理して得られた水溶化 $C_{60}(OH)_n$ の TOF-MS スペクトルである。不純物ピークが検出されていないこと、 C_{60} のピーク強度が強く検出されていることから、オープンカラムによって不純物が除去され、 $C_{60}(OH)_n$ が精製されていることが示唆された。

C-1. $C_{60}(OH)_n$ を注入したラットの 1 時間後の肝臓切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル

図 4 から図 7 は $C_{60}(OH)_n$ を注入したラットの 1 時間後の脳、肺、腎臓、肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトルである。それぞれ $C_{60}(OH)_n$ を注入していないコントロールの切片も

示している。脳、肺、腎臓の質量スペクトルでは、720 m/z に C_{60} (質量数 720) に相当するピークが検出されず、コントロールと同様の質量スペクトルであった。一方、肝臓切片の質量スペクトルから、720 m/z に C_{60} (質量数 720) に相当するピークを検出した。また、フラーレン構造が壊れるときの特有なフラグメント C_2 (24 Da) ロスも確認されたことから、肝臓に $C_{60}(OH)_n$ が存在することが示唆される。その分布は質量イメージマッピングから示されるように、肝臓切片に満遍なく存在していることも確認できた。

図 8, 9 は $C_{60}(OH)_n$ を注入したラットの 24 時間後の脳と肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトルである。脳、肝臓の質量スペクトルには、720 m/z にピークを検出されず、 $C_{60}(OH)_n$ が存在していないことがわかる

D. 考察

$C_{60}(OH)_n$ を注入してから 1 時間後では、肝臓のみに C_{60} の質量ピーク (720 m/z) が検出されたことから、 $C_{60}(OH)_n$ が肝臓に満遍なく滞留していることがわかる。一方で、24 時間後には肝臓に滞留していた $C_{60}(OH)_n$ は流れ出し、代謝したと考えられる。今回使用された $C_{60}(OH)_n$ は非常に溶解度が高いため、血液にも容易に溶解し、また $C_{60}(OH)_n$ のサイズが 1.0 nm 以下であることもあり、臓器に捕獲されずに排泄される可能性も十分にある。一方、溶解度の低い $C_{60}(OH)_n$ は $C_{60}(OH)_n$ の凝集体を形成するために、肝臓などに滞留し、代謝ができなくなることが考えられる。このことから、上記の臓器以外の部位も加え、イメージング質量分析を用いて、高溶解度の $C_{60}(OH)_n$ の濃度依存性と注入時間依存性、さらに低溶解度の $C_{60}(OH)_n$ の凝集依存性の試験を行い、ラット体内での $C_{60}(OH)_n$ の可視化し、代謝機能を行う必要がある。

E. 結論

$C_{60}(OH)_n$ の精製と、ラットに $C_{60}(OH)_n$ を注入してから、1 時間後と 24 時間後の臓器の切片をイメージング質量分析し、 $C_{60}(OH)_n$ の各臓器 (脳、肺、腎臓、肝臓) に対する $C_{60}(OH)_n$ の可視化を行った。注入 1 時間後では、肝臓に $C_{60}(OH)_n$ が存在することが示唆される。その分布は質量イメージマッピングから示されるように、肝臓切片に満遍なく存在してい

ることが確認できた。さらに注入 12 時間後では、脳、肺、腎臓、肝臓に C_{60} の質量ピークが検出されないことから、 $C_{60}(OH)_n$ は体外に排泄された可能性が示唆された。

文献

- 1) H. Tokuyama, S. Yamago, E. Nakamura, T. Shiraki, Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7918-7919 (1993).
- 2) S. H. Friedman, D. L. DeCamp, R. P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, G. L. Kenyon, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6506-6509. (1993).
- 3) R. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, J. A. Castoro, C. Wilkins, S. H. Friedman, D. L. DeCamp, G. L. Kenyon, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6510-6512, (1993).
- 4) R. F. Schinazi, R. Sijbesma, G. Srdanov, C. L. Hill, F. Wudl, *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1707-1710, (1993).
- 5) T. Da Ros, M. Prato, *Chem. Commun.* 663-669, (1999).
- 6) S. R. Wilson, Nanomedicine: fullerene and carbon nanotube biology. In *Perspectives of Fullerene Nanotechnology*; Osawa E., Eds.; Kluwer Academic: Dordrecht, pp 155-163 (2002).
- 7) E. Nakamura, H. Tokuyama, S. Yamago, T. Shiraki, Y. Sugiura, *Bull. Soc. Chem. Jpn.* **69**, 2143-2151, (1996).
- 8) Y. Yamakoshi, S. Sueyoshi, K. Fukuhara, N. Miyata, T. Masumizu, M. Kohno, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 12363-12364, (1998).
- 9) R. Bernstein, F. Prat, C. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 464-465, (1999).
- 10) E. Nakamura, H. Isobe, N. Tomita, M. Sawamura, S. Jinno, H. Okayama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 4254-4257, (2000).
- 11) W. A. Scrivens, J. M. Tour, K. E. Creek, L. Pirisi, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4517-4518, (1994).
- 12) L. L. Dugan, D. M. Turetsky, C. Du, D. Lobner, M. Wheeler, C. R. Almlı, C. K.-F. Shen, T. -Y. Luh, D. W. Choi, T. -S. Lin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9434-9439, (1997).
- 13) D. W. Cagle, S. J. Kennel, S. Mirzadeh, J. M. Alford, L. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**,

5182-5187, (1999).

- 14) P. Rajagopalan, F. Wudl, R. F. Schinazi, F. D. Boudinot, *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2262-2265, (1996).
- 15) C. M. Sayes, J. D. Fortner, W. Guo, D. Lyon, A. M. Boyd, K. D. Ausman, Y. J. Tao, B. Sitharaman, L. J. Wilson, J. B. Hughes, J. L. West, V. L. Colvin, *Nano Lett.* **4**, 1881-1887, (2004).
- 16) S. Yamago, H. Tokuyama, E. Nakamura, K. Kikuchi, S. Kananishi, K. Sueki, H. Nakahara, S. Enomoto, F. *Chem. Biol.* **2**, 385-389, (1995).

F. 研究発表

1. 論文発表

1. G Yamamoto, K. Yokomizo, M. Omori, Y. Sato, K. Motomiya, T. Hashida, T. Takahashi, A. Okubo, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Polycarbosilane-derived SiC/single-walled carbon nanotube nanocomposites", *Nanotechnology*, **18**, 145614-145618 (2007).
2. R. Justin Joseyphus, D. Kodama, T. Matsumoto, Y. Sato, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Role of polyol in the synthesis of Fe particles", *J. Magn. Magn. Mater.* **310**, 2393-2395 (2007).
3. D. Kodama, K. Shinoda, K. Sato, Y. Sato, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Synthesis of size-controlled Fe-Co alloy nanoparticles by modified polyol process", *J. Magn. Magn. Mater.* **310**, 2396-2398 (2007).
4. T. Atsumi, B. Jeyadevan, Y. Sato, K. Tohji, "Heating efficiency of magnetite particles exposed to AC magnetic field", *J. Magn. Magn. Mater.* **310**, 2841-2843 (2007).
5. M. Uo, H. Kachi, T. Akasaka, F. Watari, Y. Sato, K. Motomiya, K. Tohji, "The Purity and Thermal Stability in Air of Metal-Encapsulating Carbon Nanocapsules (MECNs)", *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.*, **15**, 303-309 (2007).
6. Y. -S. Park, A. Kasuya, A. Dmytruk, N. Yasuto, M. Takeda, N. Ohuchi, Y. Sato, K. Tohji, M. Uo, F. Watari, "Concentrated Colloids of Silica-Encapsulated Gold Nanoparticles: Colloidal Stability, Cytotoxicity, and X-ray Absorption", *J. Nanosci. Nanotechnol.* **7**, 2696-2708 (2007).
7. S. Iwata, Y. Sato, K. Nakai, S. Ogura, T. Okano, M. Namura, A. Kasuya, K. Tohji, K. Fukutani, "Novel method to evaluate the carbon network of single-walled carbon nanotubes by hydrogen physisorption", *J. Phys. Chem. C*, **111**, 14937-14941 (2007).
8. F. Watari, K. Tamura, A. Yokoyama, K. -I. Shibata, T. Akasaka, B. Fugetsu, K. Asakura, M. Uo, Y. Totsuka, Y. Sato, K. Tohji, "Biochemical and Pathological Responed of Cells and Tissue to Micro- and Nanoparticles from Titanium and other Materials", *Handbook of Biomineralization -Medical and Clinical Aspects-*, Matthia Epple and Edmund Baeuerlein editors, 127-144 WILEY-VCH, Verlag, GmbH & Co.KgaA(2007).
9. 佐藤義倫, "カーボンナノチューブのリスク評価の動向", *応用物理*, **76**, 1154-1158 (2007).
10. 佐藤義倫, 田路和幸, "カーボンナノチューブ", *ナノ粒子の有害性評価とリスク対策*, 技術情報協会 (2007).
11. A. Takahashi, T. Ishiyama, H. Takahashi, Y. Sato, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Effect of morphology of CdS thin film on the photocatalytic decomposition of hydrogen sulfide", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 119-122 (2007).
12. D. Kodama, K. Shinoda, K. Sato, Y. Sato, K. Tohji, B. Jeyadevan, "Morphology control of FeCo alloy particles synthesized by polyol process", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 126-129 (2007).
13. G Yamamoto, T. Hashida, K. Adachi, Y. Sato, K. Tohji, "Evaluation of tribological properties of binder-free single-walled carbon nanotube solids for solid lubrication application", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 130-134 (2007).
14. T. Hosono, H. Takahashi, Y. Sato, K. Tohji, B. Jeyadevan, "Magnetite nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia using modified oxidation method", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 135-138 (2007).
15. I. Waki, Y. Sato, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Efficient synthesis of gadolinium carbide encapsulating carbon nanocapsules", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 139-142 (2007).
16. M. Uebayashi, Y. Sawada, Y. Sato, T. Itoh, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Characterization of Pt-based transition metal alloy electrodes for PEFC", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 162-165 (2007).
17. N. Tsuchiya, Y. Sato, N. Aoki, A. Yokoyama, F. Watari, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Evaluation of multi-walled carbon nanotube scaffolds for osteoblast growth", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 166-169 (2007).
18. S. Ogino, Y. Sato, G Yamamoto, K. Sasamori, H. Kimura, T. Hashida, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Estimation of the number of cross-links of multi-walled carbon nanotube films formed

- by a dehydration condensation reaction”, *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 175-178 (2007).
19. S. Yokoyama, H. Takahashi, Y. Sato, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Effect of crystalline structure of Cd(OH)₂ precursor on the photocatalytic activity of stratified CdS”, *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 179-181 (2007).
 20. Y. Sato, A. Yokoyama, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Preparation of size-controlled hat-stacked carbon nanofibers”, *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 186-189 (2007).
- ## 2. 学会発表
1. Y. Sato, S. Ogino, G. Yamamoto, K. Sasamori, H. Kimura, T. Hashida, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Relation of the Number of Cross-links and Mechanical Properties of Multi-Walled Carbon Nanotube Films Formed by a Dehydration Condensation Reaction”, 2007 MRS Spring Meeting, Program & Exhibit Guide P218, San Francisco, California, US, 2007. 4. 10.
 2. Y. Sato, K. Hasegawa, N. Ito, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Preparation and Properties of Rubber Filled with Radial Single-walled Carbon Nanotubes”, 2007 MRS Fall Meeting, Program & Exhibit Guide P321, Boston, Massachusetts, US, 2007. 11.29.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 佐藤義倫, 田路和幸, 菲澤 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.
 6. 佐藤義倫, 長谷川研二, 伊藤信幸, 本宮憲一, B. ジャヤデワン, 田路和幸, “放射状単層カーボンナノチューブを補強材としたゴムの調製と特性”, 第33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, P219, 福岡県, 福岡市 2007. 7. 13.
 7. 佐藤義倫, 脇 一平, 名村 優, 大久保 昭, 木村久道, 本宮憲一, バラチャンドラン ジャヤデワン, 田路和幸, “LaC₂ 内包カーボンナノカプセル固化体の作製”, 第4回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」講演要旨集, P19, 東京都, 江戸川区 2007. 8. 1.
 8. 佐藤義倫, 久保拓也, 菲澤 崇, 赤坂 司, 横山敦郎, 田路和幸, “イメージング質量分析を用いた生体組織観察 (3) -水溶性C₆₀の精製-”, 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3回研究発表会要旨集, P9 北海道, 登別市 2007. 11. 12.
 9. 佐藤義倫, 土屋直実, 内田拓哉, 本宮憲一, バラチャンドラン ジャヤデワン, 田路和幸, 青木尚史, 亘理文夫, 横山敦郎, “異なる直径を持つ多層カーボンナノチューブ上での骨芽細胞の細胞増殖因子”, 第18回日本MRS学術シンポジウム講演要旨集, P307, 東京都, 千代田区 2007. 12. 8.

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

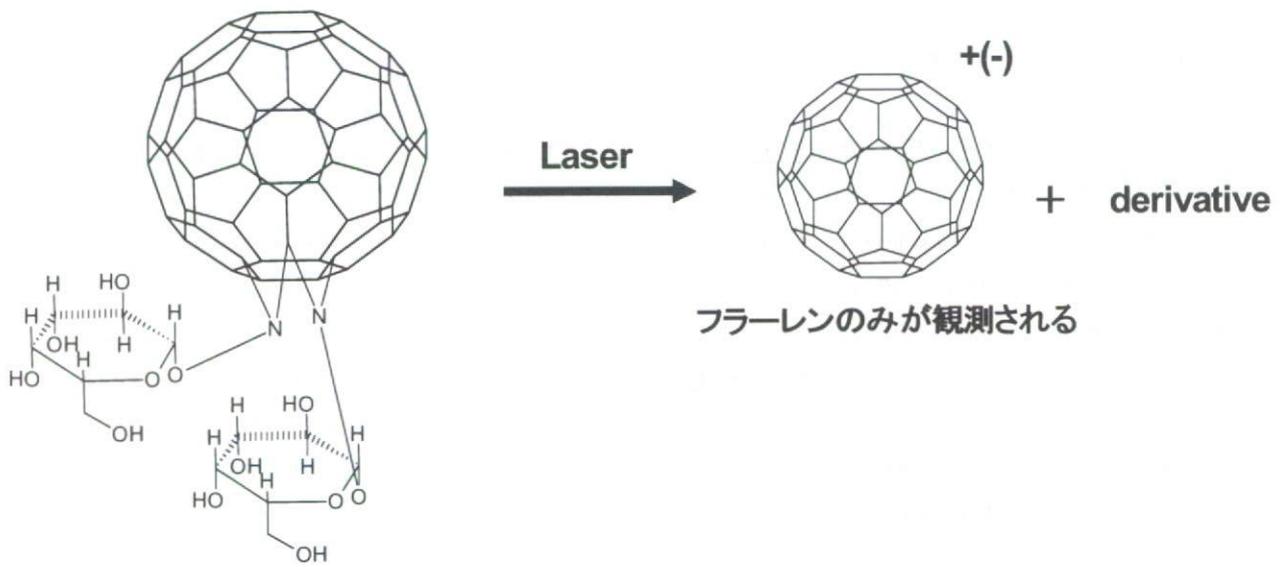


図1 フラーレン誘導体のイオン化

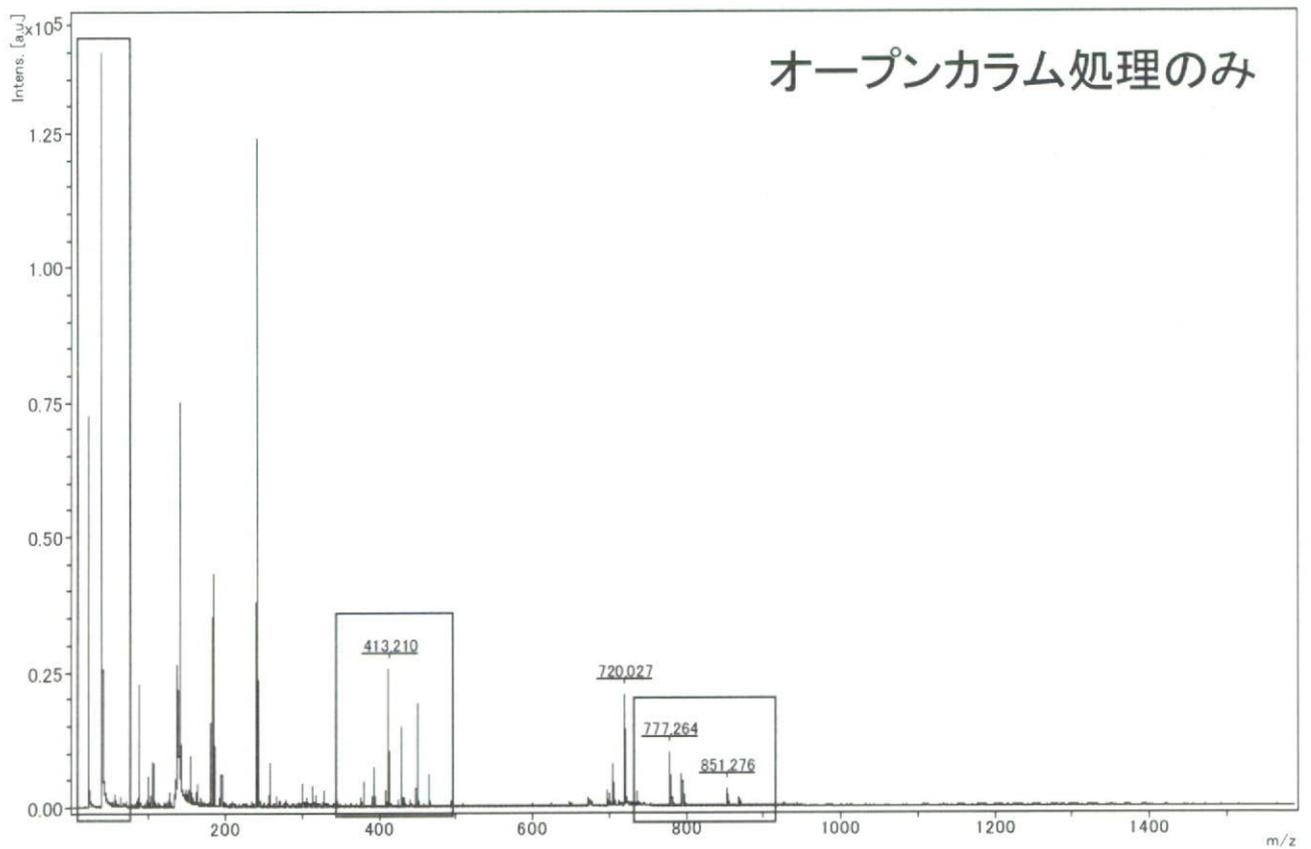


図2 オープンカラムのみで精製処理を行った $C_{60}-(OH)_n$ の TOF-MASS 質量スペクトル.

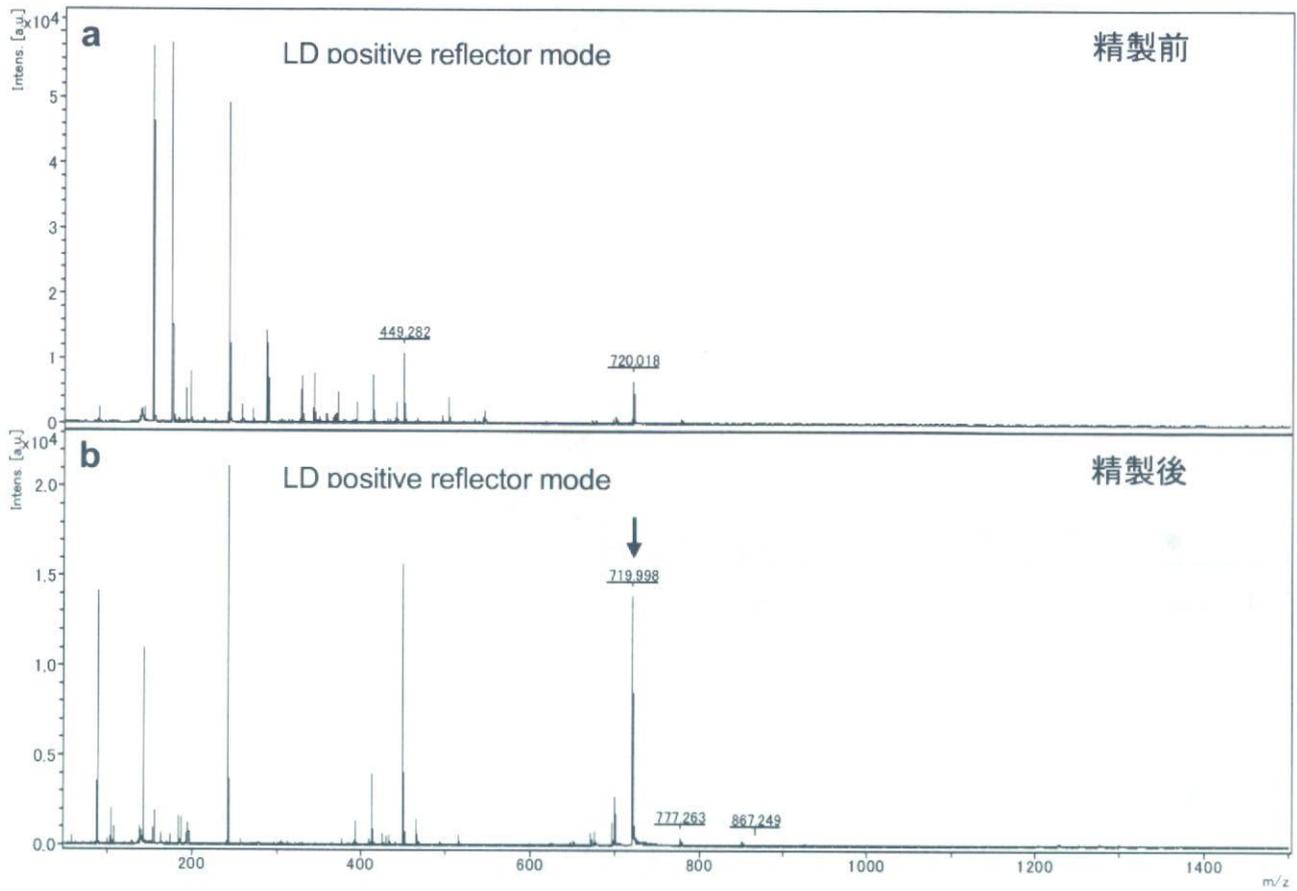


図3 (a) イオン交換樹脂のみで精製処理を行った $C_{60}-(OH)_n$ の TOF-MASS 質量スペクトル. (b) イオン交換樹脂とオープンカラムを組み合わせた精製処理の $C_{60}-(OH)_n$ の TOF-MASS 質量スペクトル.

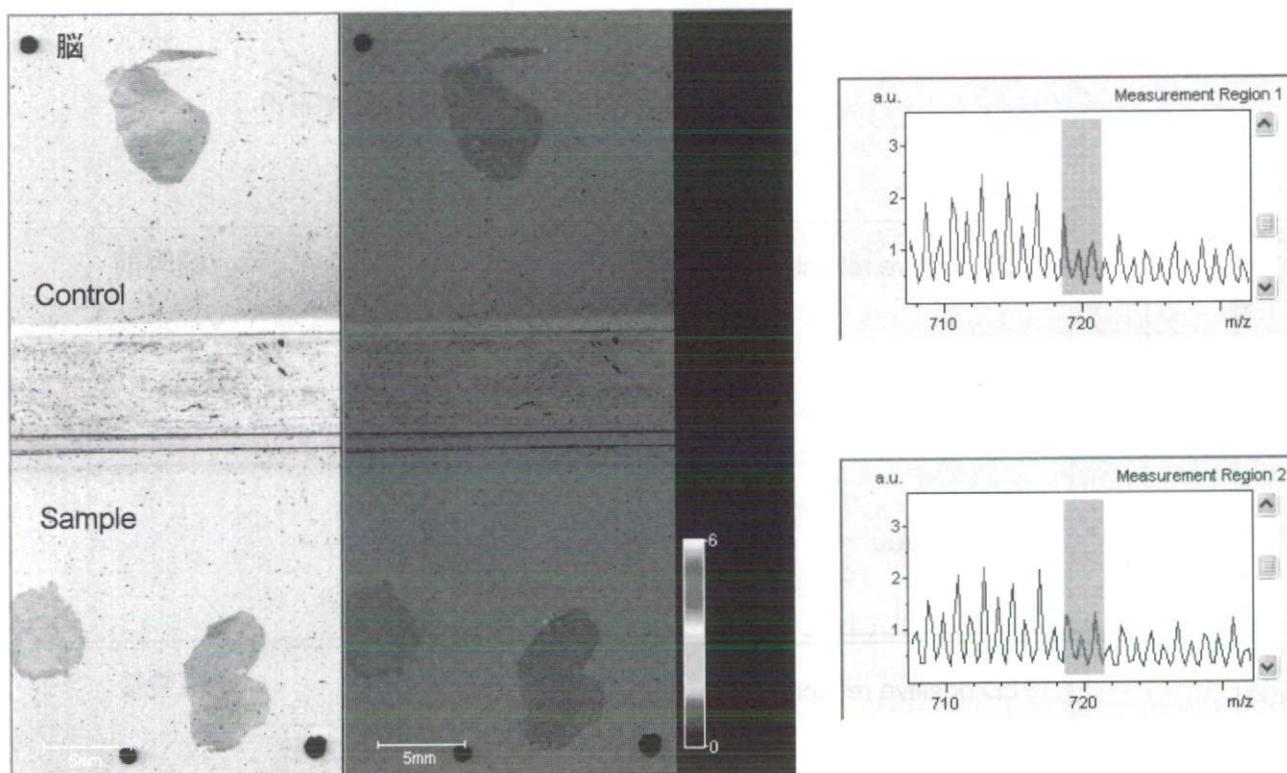


図4 $C_{60}(OH)_n$ を注したラットの1時間後の脳の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。コントロール（上）、サンプル（下）。

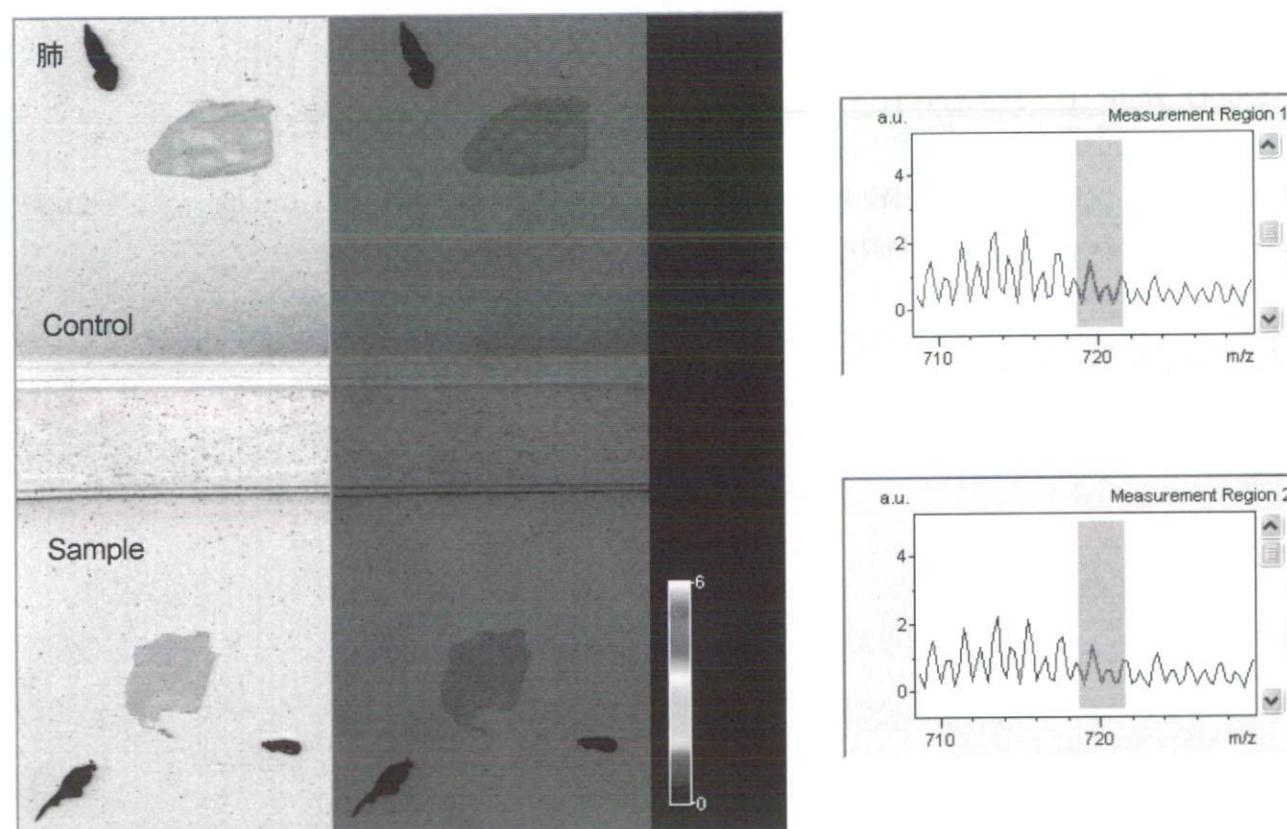


図5 $C_{60}(OH)_n$ を注したラットの1時間後の肺の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。コントロール（上）、サンプル（下）。

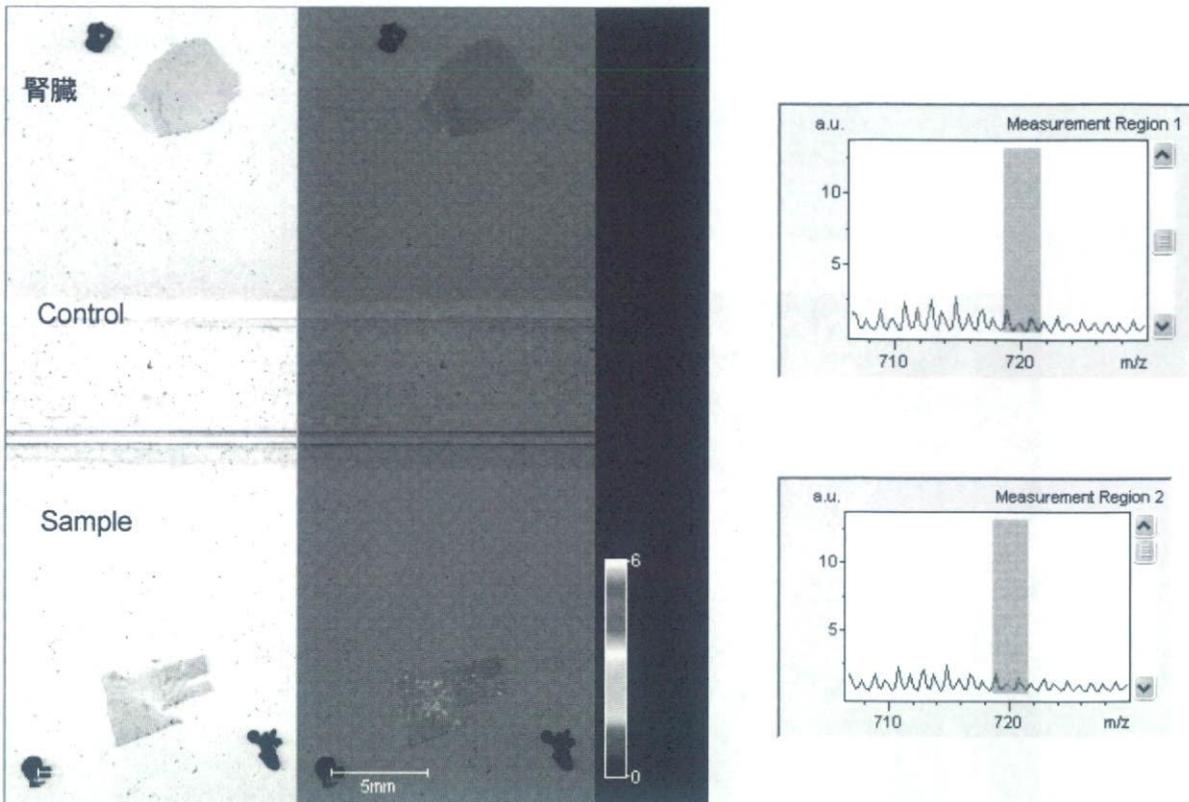


図6 $C_{60}-(OH)_n$ を注したラットの1時間後の腎臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。コントロール（上）、サンプル（下）。

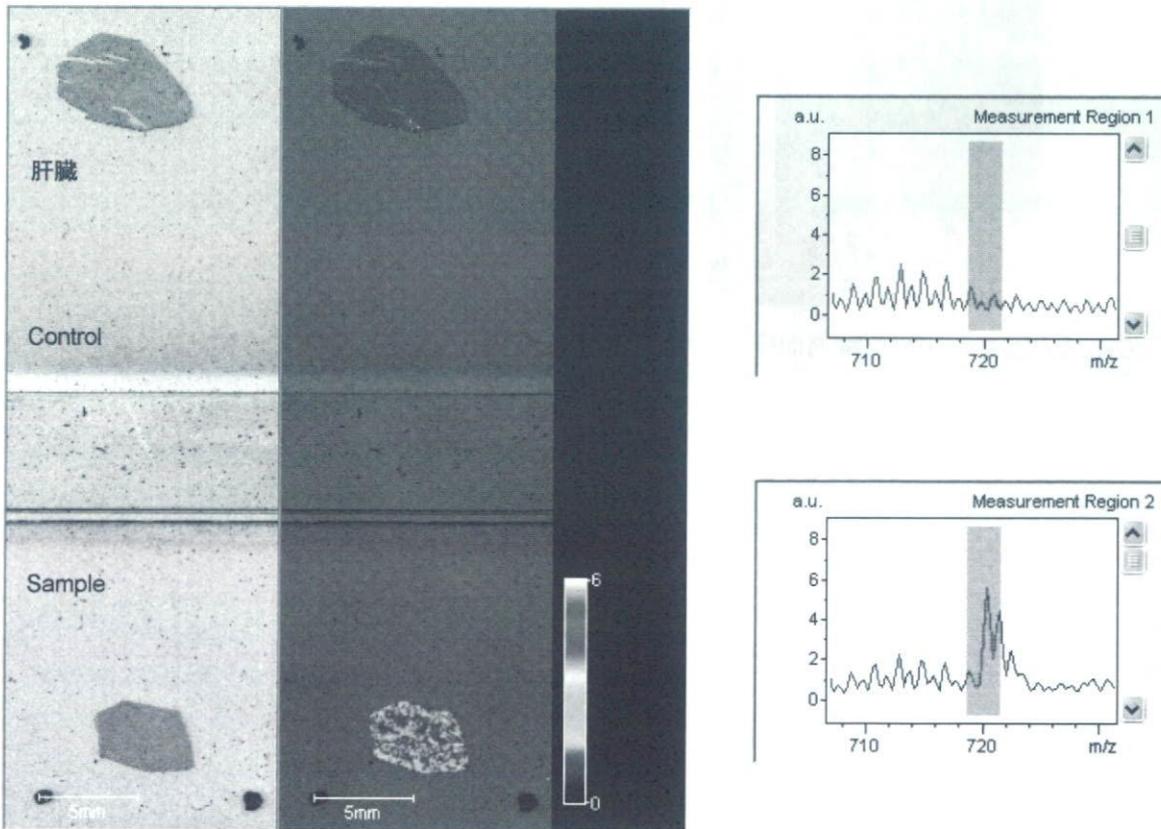


図7 $C_{60}-(OH)_n$ を注したラットの1時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。コントロール（上）、サンプル（下）。

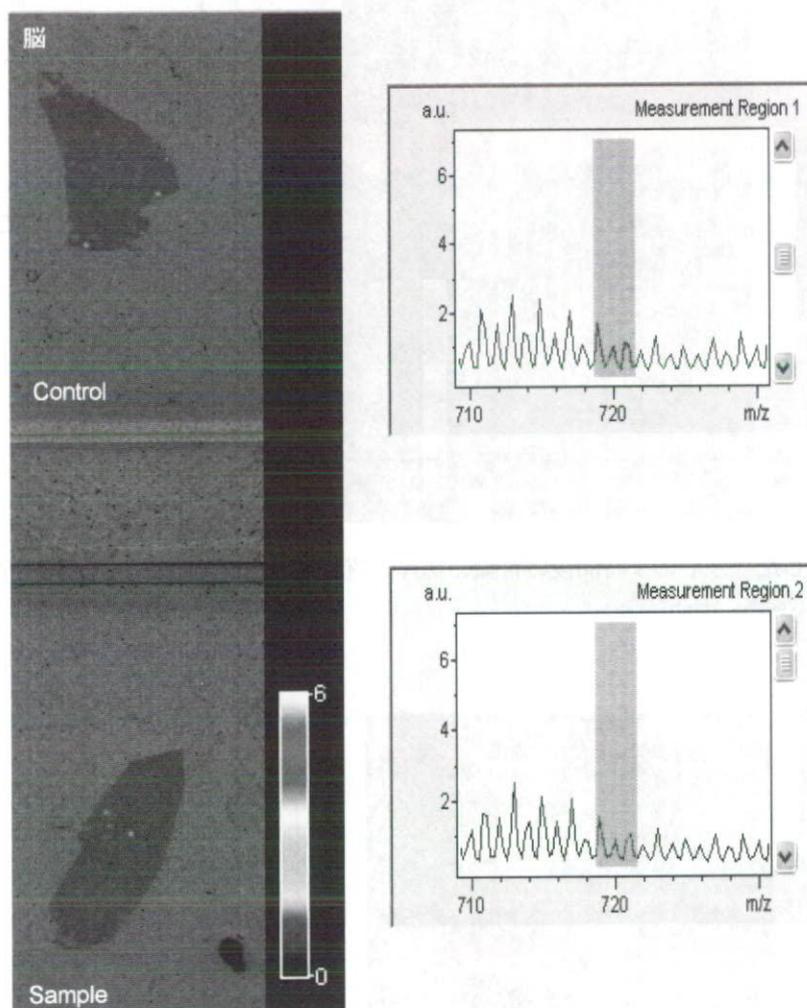


図 8 $C_{60}(OH)_n$ を注したラットの 24 時間後の脳の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。コントロール (上)、サンプル (下)。

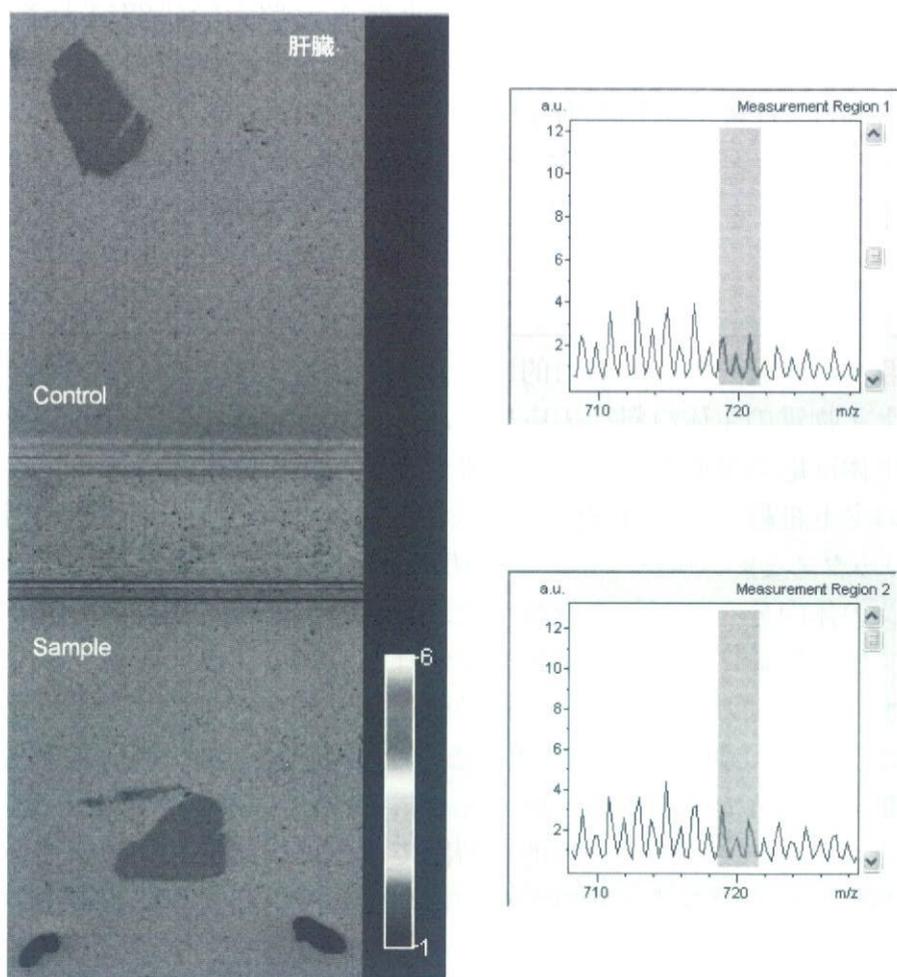


図9 $C_{60}(OH)_n$ を注したラットの24時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。コントロール（上）、サンプル（下）。

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
ー生体材料への応用と生体内分布ー

| | | |
|-------|-------|-----------------|
| 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 | 平田恵理 | 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教 |
| 研究協力者 | 野田坂佳伸 | 北海道大学歯学研究科助教 |
| 研究協力者 | 笠井孝夫 | 北海道大学歯学研究科大学院生 |
| 研究協力者 | 韭澤 崇 | ブルカー・ダルトニクス株式会社 |

研究要旨 我々の研究の最終的な目的は、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の生体材料への応用である。本研究においては、カーボンナノ物質に対する生体反応の解明を目的として研究を行った。生体反応として、各種カーボンナノ物質の皮下組織への2年間に亘る長期埋入後の組織学的、超微細構造学的検索および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を用いた静注後の水溶化フラーレンの体内分布の解析を行なった。実験動物としてラットを用いた長期埋入試験の結果、皮下組織においては壊死や変性などの強い炎症反応が生じないこと、長期埋入後の生体反応はカーボンナノ物質の構造に影響されること、またカーボンナノ物質の構造は、2年間の埋入で変化が生じることが明らかとなった。水溶化フラーレンは静注1時間後に肝臓で検出されたが、脳、肺、脾臓では検出されず、24時間後では、いずれの組織にも検出されず、比較的短時間で体外に排出される可能性が示された。以上の結果から、カーボンナノ物質の体内における安全性と生体材料として応用する可能性が示唆された。

A. 研究目的

最近、ES細胞やiPS細胞など再生医学に関する研究が著しく発展し、国民の再生医療への期待が高まっている。新しい方法や技術に基づく再生医療や遺伝子治療などの治療法の開発は、超高齢化社会が到来し、生活習慣病の危険が増加しつつある現在、国民の健康の保持に重要であるとともに、増大する医療費の抑制にも大きく貢献するものと思われる。特に、新たなる戦略による生体材料の開発は医学のみならず広く科学全体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貢献することが期待されている。

一方、工業的に非常に優れた材料としてこれまで

に多くの建築物等に使用されてきたアスベストの被曝長期間経過後に生じる中皮腫等の問題が、最近報道され、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医学・歯学領域に応用することを目的に、カーボンナノ物質を応用した生体材料の開発とともにカーボンナノ物質の生体に対する安全性について数年来研究を行っている。

我々の研究の最終的な目的は、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の生体材料への応用である。本研究においては、カーボン

ナノ物質の生体反応の解明について研究を行った。アスベストが生体内に取り込まれた後、十数年以上という長期間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を組織学的、超微細構造学的に検索するとともに、カーボンナノ物質が生体内に取り込まれた場合の体内での分散、蓄積および排出を明らかにするために、水溶化フラーレン静注後の生体内分布を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で分析した。

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 μm 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, 2.0 および 0.4 μm 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。 (図 3) 埋入後、1, 4, 16 週、1 年および 2 年後に Pentobarbital Sodium による全身麻酔後、グルタルアルデヒドによる灌流固定を行い周

囲組織とともに摘出した。摘出した組織を、グルタルアルデヒドにて浸漬固定後 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、透過型電子顕微鏡 (日立 H2000) および高分解能透過型電子顕微鏡 (日立 H-7650 および日立 H-9500) を観察した。

2. フラーレンの生体内分布の検索

1) 材料

(1) 水溶化フラーレンの調整

体内におけるフラーレンの分布を検索するため、フラーレンに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

(1) フラーレン検出確認のための予備実験

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、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。

(2) 静注後のフラーレンの生体内分布について

7 週齢ウィスター系雄性ラットを実験動物として用いた。凍結乾燥した水溶化フラーレンを生理食塩水に 3mg/ml の濃度に溶解し、エーテルおよび Pentobarbital Sodium の腹腔内注射による全身麻酔下でラット尾静脈より 1ml 注入した。注入後 1 および 24 時間後に、エーテルの過量吸入によりラットを安楽死後、脳、肺、肝臓、脾臓および腎臓を摘出した。摘出した試料を液体窒素にて凍結し、凍結切片を作製し、凍結乾燥後 MALDI-TOF-MS により分析した。サンプル調整条件としては、各組織、コントロール (生食) およびフラーレン投与群を同時に測定した。イメージの描写は、シグナルの強度を指定してすべて同じ条件で行った。測定条件は、印加電圧加速電圧 19kV, 反射電圧 21kV, 測定モードは Pos Reflector mode とした。凍結切片の一部については、通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

(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)。

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4-5, 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た。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年後においては、220MWCNTsは、組織内で大きな凝集塊として観察され、薄層の線維性結合組織が認められた(図4-8)。凝集塊表面には、異物巨細胞が観察されたが、肉芽腫性炎の状態は呈していなかった(図4-9)。

(2)825MWCNTsについて

埋入1週間後、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4-10)。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4-11)、マクロファージの細胞質内にも凝集した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4-12)。高分解能TEM観察では、MWCNTsの層状の構造が明瞭に観察された(図4-13)。

埋入16週間後では、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4-14)。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4-15)。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4-16)。

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いた。16週間までは、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4-17, 18)。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4-19)。

2年後においては、MWCNTsの集塊は薄層の線維性結合組織に被包されていた(図4-20)。強拡大像においては、比較的小さなMWCNTs集塊は、マクロファージに貪食されており、大きなMWCNTs集塊表面には異物巨細胞が観察された(図4-21)。TEM観察においては、1年後に比較し、さらに凝集程度が低くなる傾向を示したが、チューブ状の構造には変化が認められなかった。高分解能TEMにおいては、MWCNTsの外層が1週間後と比較し、肥厚する傾向を示し(図4-23)、さらに最外層のMWCNTsには、構造の変化が観察され、1週間後と比較すると層状構造が不明瞭になっていた(図4-23)。

2) H-CNFsについて

(1)600H-CNFs : 埋入1週間後においては、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週後では、H-CNFsを貪食したマクロファージの集積が観察されたが、その周囲は極薄い線維性結合組織の被膜に覆われているに過ぎなかった。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)。

埋入2年後においては、HCNFsは、線維性結合組織の中に観察され、周囲には炎症性の細胞はほとんど観察されなかった(図5-7)が、一部にはHCNFsを貪食しているマクロファージが毛細血管近傍に観察された(図5-8)。高分解能TEM 観察においては、1週では明瞭に観察された、グラフェンシートのエッジが不明瞭となり(図5-9)、層状の構造も不明確となっているものも観察された(図5-10)。2)1200H-CNFs:1週後においては、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5-11)。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5-12)。16週後においては、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5-13)。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5-14)。

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5-15)。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5-16)。

2. フラーレンの生体内分布の検索

(1) 予備実験について

MALDI-TOF-MSの結果を図に示す。今回の検索では、肝臓におけるフルーレンの局在が明確に示された(図6-1, 2)。

(2) 静注後のフルーレンの生体内分布について

静注後1時間の脳のMALDI-TOF-MSのマッピング像とサムスペクトルを図に示す(図6-3)。左がマッピング像、右がサムスペクトルである。それぞれ上段がコントロールである生理食塩水を静注したものであり、下段が水溶性フルーレンを静注したものである。ともに、マッピング像でフルーレンは検出されず、サムスペクトルにおいても720にピークは検出されていない。

図(図6-4)に静注後1時間の肝臓のMALDI-TOF-MSのマッピング像とサムスペクトルを示す。上段が生理食塩水、下段がフルーレンである。マッピング像においてフルーレンが検出され、サムスペクトルにおいても720に強いピークが検出されている。図6-5は、凍結切片のヘマトキシリンエオジン染色をした光顕像である。左が生食、右がフルーレンであり、特に変化は認められない。

図(図6-6)は、静注後1時間の腎臓のMALDI-TOF-MSのマッピング像とサムスペクトルである。切片全体としては、検出されないが、下段の図において、一部の点では、サムスペクトルにおいて720のピークが検出されている。

1時間後の切片では、他の脳や脾臓には検出されなかった。

静注24時間後の肝臓のMALDI-TOF-MSのマッピング像とサムスペクトルを示す(図6-7)。コントロール、フルーレン静注ともにフルーレンは検出され

なかった。

図6-8に静注24時間後の脳のMALDI-TOF-MSのマッピング像とサムスペクトルを示す。フラーレン静注したもののマッピング像にわずかに強度の異なる部分が認められるが、サムスペクトルではピークは検出されなかった。他の腎臓、肺および脾臓には検出されなかった。

.....

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年後以降においては、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違には、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と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、短縮など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。しかし、高分解能TEMによる観察では、MWCNTsの外層の肥厚が観察され、最外層の層状構造が不明瞭になっていることが明らかになった。昨年度までの結果では、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、化学的に安定しているため生体内においては、結晶構造には変化が生じないと考えていたが、今回の結果から、MWCNTsにおいても結晶構造の変化が生じることが示唆された。この知見は、MWCNTsを生体材料として開発する際に大きく貢献するものと思われる。

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違の原因として、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こりやすいことも 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2年後の高分解能 TEM 観察において、グラフェンシートのエッジの不明瞭化が認められた。これは、埋入1週間後においては観察されず、生体内でグラフェンシートの結晶構造の変化を証明するものと考えられる。

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

本研究は、体内に摂取されたカーボンナノ物質の移行や排出を明らかにすることを目的に行われた。昨年来より行っている予備実験で、水溶化フラーレンを、MALDI-TOF-MS にて分析することにより、非常に明瞭にフラーレンを検出することが可能であった。他のマッピングとは異なり、図に示したようにバックグラウンドとの違いは明確であり、少量のフラーレンであっても十分検出が可能と推察された。この結果をもとに、ラット尾静脈から水溶化フラーレンを注入した。注入1時間後に、肝臓で明確なフラーレンのピークが検出され、腎臓の一部に弱いピークが検出された。検出対象とした肺、脳および脾臓の他の臓器からは検出されなかった。また、24時間後においては、肝臓、腎臓、肺、脳および脾臓のすべての臓器で検出されなかった。これらの結果から、水溶化フラーレンは、静注後比較的短期間は肝臓に集積するが、腎臓から排出され、24時間後には、

体外に排出されることが推察された。しかし、以上の5種類以外の臓器については、検討していないため、今後この仮説を実証するため、他の臓器についても検討する必要がある。また、本研究においては、水溶化フラーレンを1回の静注で行なったが、何度も水溶化フラーレンを注入し、経時的な観察を行なうことも体内での蓄積を検討する上で重要であり、次年度行うことを考えている。

E. 結論

カーボンナノ物質の皮下組織長期埋入時の生体反応、フラーレンの体内分布についての研究を行い、以下の結論を得た。

1. カーボンナノ物質の生体反応には、サイズや結晶構造が影響する。
2. MWCNTs および H-CNFs を皮下組織に長期埋入後も強い炎症反応は観察されなかった。
3. 皮下組織への長期埋入で、MWCNTs および H-CNFs の結晶構造も変化することが示された。
4. MALDI-TOF-MS を用いることにより、フラーレンの生体内組織における検出の可能性が示唆された。
5. 水溶化フラーレンを静注すると、1時間後では肝臓に検出されたが、24時間後では、脳、肝臓、肺、腎臓および脾臓では検出されず、体外に排出されることが推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Aoki, T. Akasaka, F. Watari, A. Yokoyama. "Carbon nanotubes as scaffolds for cell culture and effect on cellular functions" *Dental Materials Journal*. 26;178-185,2007.
2. Aoki, N., Yokoyama, A., Nodasaka, Y., Akasaka, T., Uo, M., Sato, Y., Tohji, K., Watari, F. "Carbon Nanotubes Deposited on Titanium Implant for Osteoblast Attachment" *Journal of Bionanoscience*. 1:14-16,2007.
3. W. Wang, F. Watari, M. Omori, S. Liao, Y. Zhu, A. Yokoyama, M. Uo, H. Kimura, A. Ohkubo. "Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials" *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*. 82B:223-230,2007.

4. Wang, W., Yokoyama, Liao, S., A.Omori, M., Zhu, Y., Uo, M., Akasaka, T., Watari, F., "Preparation and Characteristics of a binderless carbon nanotube monolith and its biocompatibility" Materials Science & Engineering C. in press.

2. 学会発表

1. Hirata,E., Yokoyama,A., Sato,Y., Nodasaka,Y., Uo,M., Akasaka,T., Tohji, K. Watari,F. Biocompatibility of Carbon Nanosubstances in the Subcutaneous Tissue. The 33rd Fullerene-Nanotubes General Symposium. July 11-13, 2007. Fukuoka.

2. 平田恵理, 横山敦郎, 野田坂佳伸, 宇尾基弘, 赤坂司, 田路和幸, 亘理文夫 カーボンナノ物質の構造が生体反応に与える影響について, 第4回ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会, 平成19年8月1日, 東京

3. 平田恵理, 野田坂佳伸, 佐藤義倫, 葦澤崇, 赤坂司, 宇尾基弘, 大堀ことは, 亘理文夫, 田路和幸, 横山敦郎. ナノ物質の生体内挙動について—皮下および骨膜下での反応とフラーレンの体内移行—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の体内動態可視化法の開発第3回研究成果発表会, 平成19年11月12-13日, 登別

4. 平田恵理, 野田坂佳伸, 佐藤義倫, 葦澤崇, 赤坂司, 宇尾基弘, 大堀ことは, 亘理文夫, 田路和幸, 横山敦郎. ナノ物質の生体内挙動についてカーボンナノ物質の構造が生体反応に与える影響について, 第5回ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会, 平成19年12月18日, 名古屋

5. 横山敦郎, 佐藤義倫, 葦澤崇, 赤坂司, 高橋ともみ, 笠井孝夫, 田路和幸, 亘理文夫 カーボンナノ物質の生体内での動態 ラット尾静脈より注入した水溶化フラーレンの生体内分布 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の体内動態可視化法の開発第3回研究成果発表会, 平成20年2月25-26日, 苫小牧

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

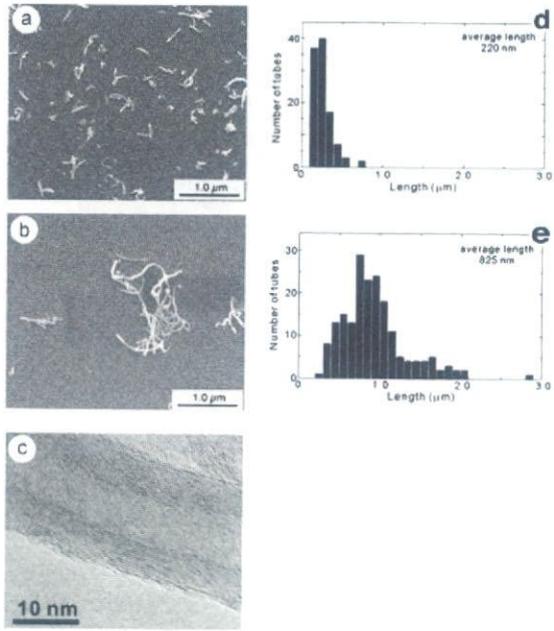


图 1

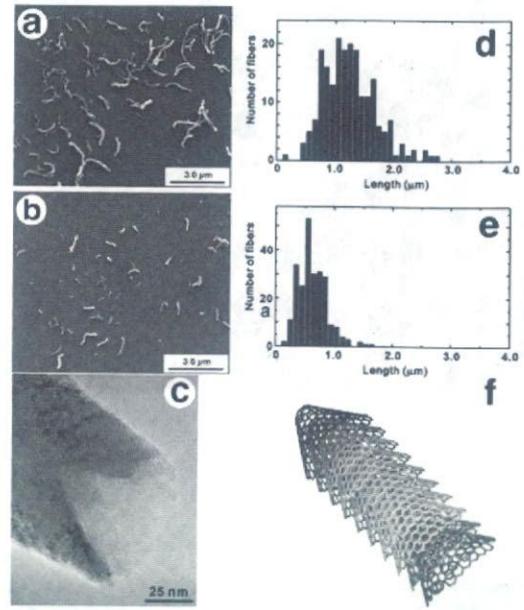


图 2

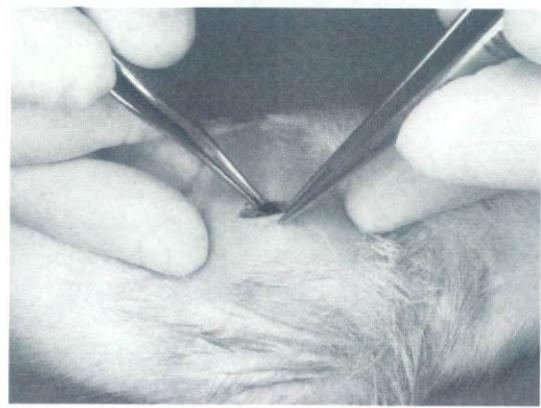
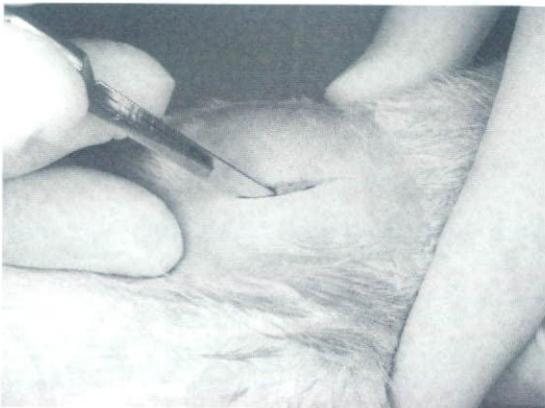


图 3

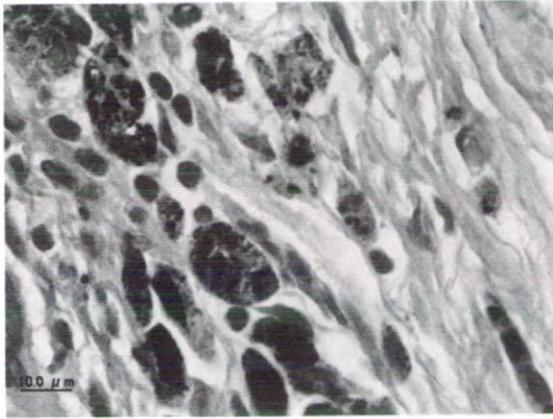


图 4-1

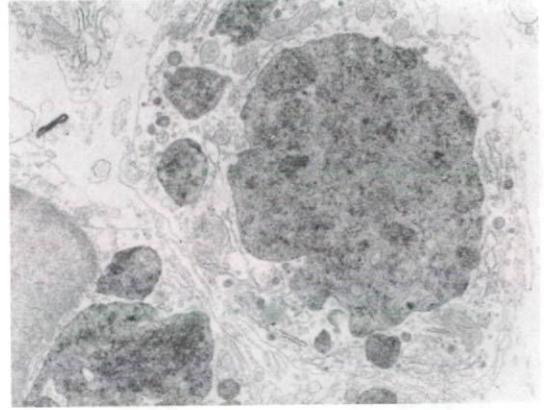


图 4-2

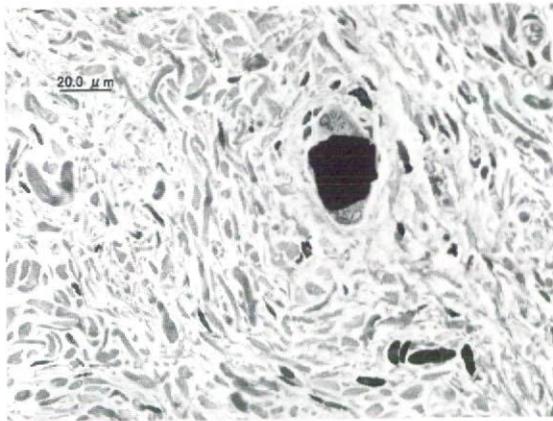


图 4-3

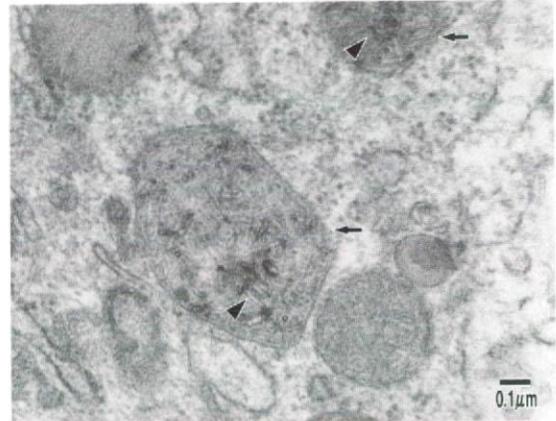


图 4-4

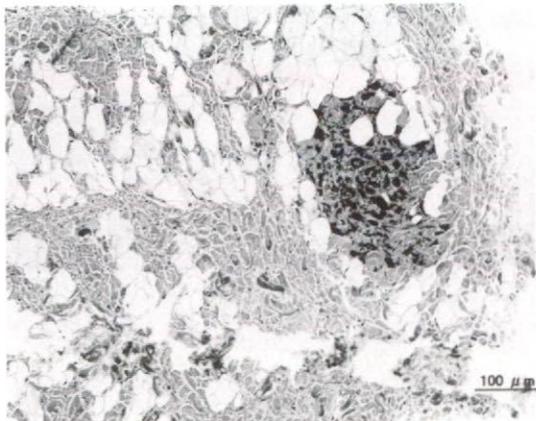


图 4-5

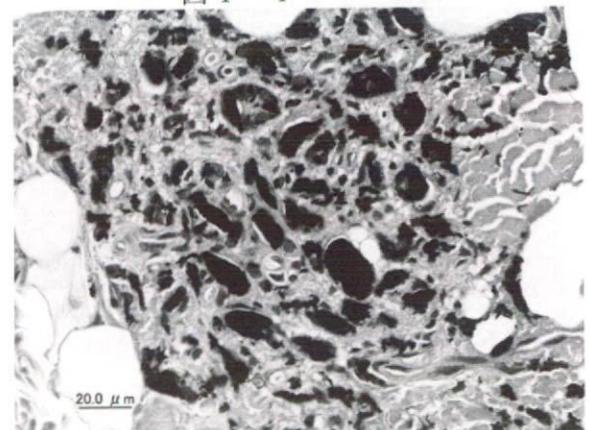


图 4-6

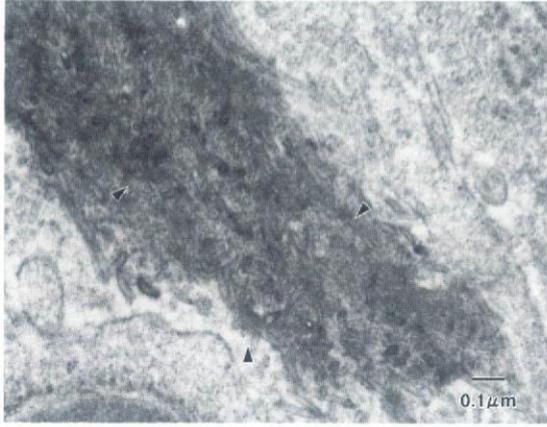


图 4-7

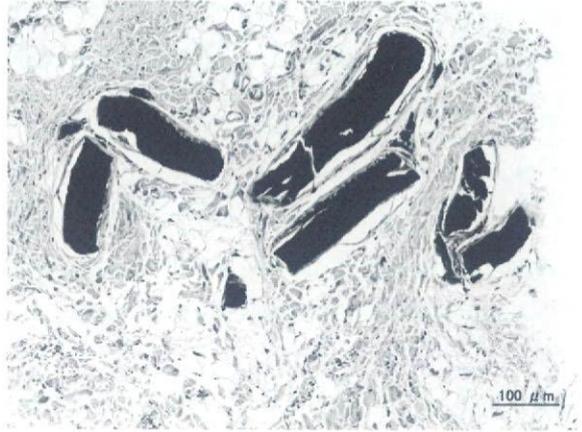


图 4-8

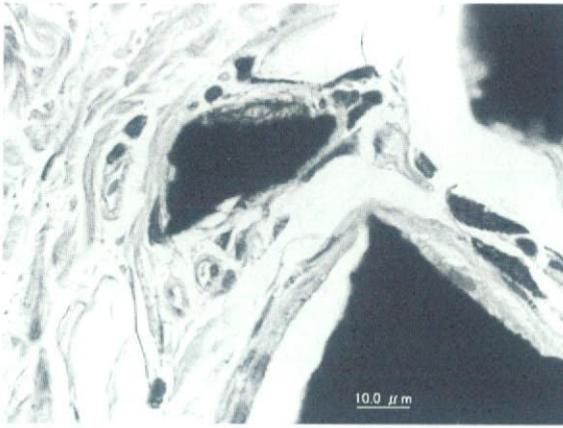


图 4-9

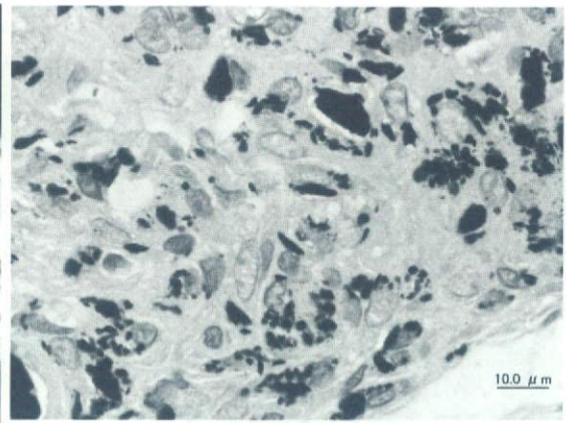


图 4-10

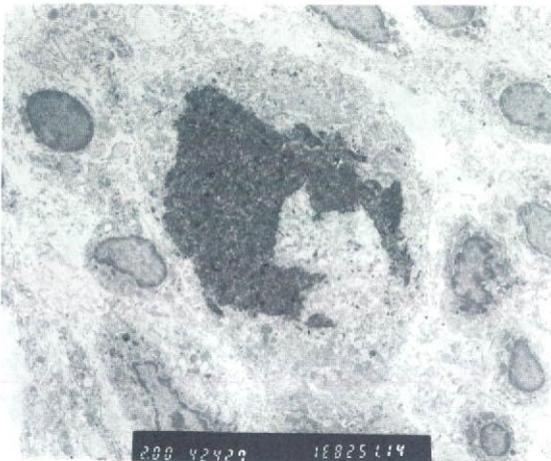


图 4-11

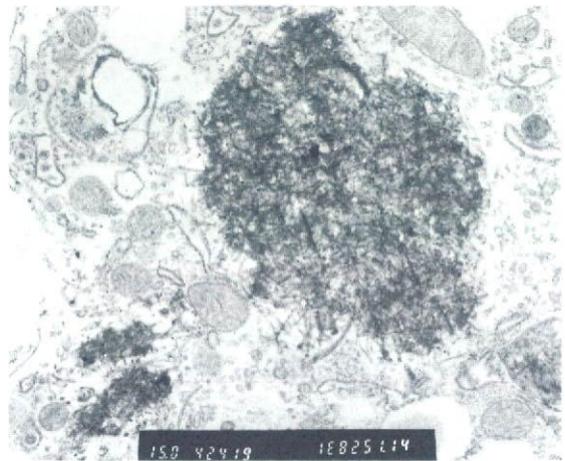


图 4-12