

図11 肉厚および肉薄MWNTから得られた複合材料の体積抵抗率

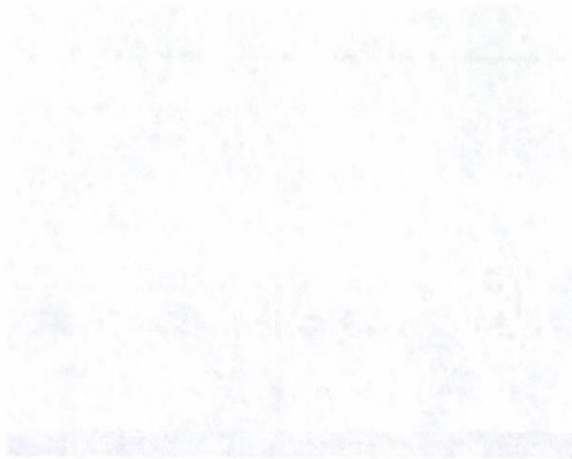


図12 肉厚MWNTの分散状態

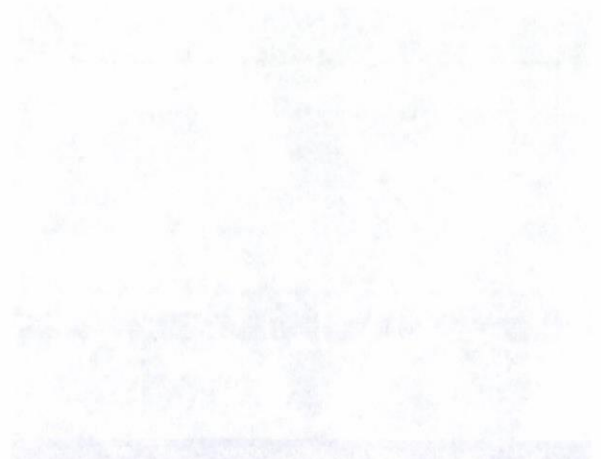


図13 肉薄MWNTの分散状態



図14 肉厚MWNTの体積抵抗率とMWNT含有率の関係



図15 肉薄MWNTの体積抵抗率とMWNT含有率の関係

## 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（3）

分担研究者	田路和幸	東北大学大学院環境科学研究科教授
研究協力者	佐藤義倫	東北大学大学院環境科学研究科助教
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** 我々は、フラーレン誘導体にエネルギーを与えると、フラーレンと誘導体に解離することに注目し、フラーレンがイメージング分子として使用できることを提案してきた。このフラーレンがイメージング分子として使用すれば、近年注目されているフラーレンの代謝を、放射性ラベリングせずに調べることが可能となる。昨年度の予備実験において、 $C_{60}-(OH)_n$  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から、720 m/z に  $C_{60}$ （質量数 720）に相当するピークを検出し、肝臓のみに  $C_{60}-(OH)_n$  が存在することが示唆された。一方、24 時間後の各種臓器切片の質量スペクトルでは、720 m/z の  $C_{60}$  に相当するピークが検出されなかった。本年度は、イメージングの空間分解能を向上させるために、イオン化で使用するレーザーのビーム径を小さく、かつ高周波である固体レーザーを開発した。この開発した固体レーザーを装備した飛行時間型質量分析計（TOF-MS: time-of-flight Mass spectrometry）を使用して、濃度 3mg/mL の  $C_{60}-(OH)_n$  生理食塩水 1mL を、ラットの尾静脈に注入して、1 時間後と 24 時間後の臓器の切片を詳細にイメージング質量分析することにより、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。さらに今年度は統計学的解析も取り入れ、臓器内に  $C_{60}-(OH)_n$  が存在することの実証を目的とした。

$C_{60}-(OH)_n$  を注入したラットの1時間後の肝臓切片の質量スペクトルから、720 m/z に  $C_{60}$  に相当する質量スペクトルを検出するものの、ノイズとの差が小さいため、 $C_{60}-(OH)_n$  が肝臓内に存在すると断言できなかった。一方、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から、 $C_{60}$  に相当するピークを検出し、また肝臓切片のすべての場所に  $C_{60}$  がイメージングされていることから、 $C_{60}-(OH)_n$  が満遍なく肝臓に存在することが明らかになった。さらに  $C_{60}-(OH)_n$  を注入したラットの24 時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングにおいて、質量数 720 での受信者動作特性曲線（ROC 曲線）を描いた結果、優位差のある曲線が得られ、確かに  $C_{60}$  が肝臓に存在することが示唆された。また投与サンプルとコントロールの主成分分析（PCA）におけるローディングプロットでも、質量数 720 がアウトライアとして現れていることから、 $C_{60}$  が肝臓組織に元々存在しないものであることを示し、つまり  $C_{60}-(OH)_n$  が肝臓にあることが示唆された。このことから、取扱いが困難な放射性物質をラベリングせずに、TOF-MS を用いたイメージング質量分析により、 $C_{60}-(OH)_n$  の臓器内の可視化に初めて成功した。

## A. 研究目的

これまでにフラレンの毒性評価の研究は数多くされてきた<sup>15</sup>。オオクチバスをフラレン ( $C_{60}$ ) の凝集体のある水槽において飼育すると、オオクチバスの脳内に酸化ストレスを誘導するという報告がされて以来<sup>6</sup>、生体内でのフラレンの代謝経路は非常に注目を浴びている。しかし、フラレンの代謝経路の測定は、フラレンに放射性ラベリングしなければならないことと、放射性物質を扱うことによる制限があること、などにより進んでいない<sup>7</sup>。我々は、フラレン誘導体にエネルギーを与えると、フラレンと誘導体に解離することに注目し、フラレンがイメージング分子として使用できることを提案してきた。フラレンがイメージング分子として機能すれば、フラレンの代謝を放射性物質ラベリングせずに測定が可能となる。一昨年度ではフラレンが質量イメージング分子になりうることを示し、昨年度の予備実験では、 $C_{60}(OH)_n$  を尾静脈に注入したラットの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から、720 m/z に  $C_{60}$  (質量数 720) に相当するピークを検出し、肝臓のみに  $C_{60}(OH)_n$  が存在することが示唆された。一方、24時間後の各種臓器切片の質量スペクトルでは、720 m/z に  $C_{60}$  に相当するピークが検出されなかった。このことから、本年度は、質量マッピングの分解能を向上させるため、イオン化するレーザーの開発を行い、濃度 3 mg/mL の  $C_{60}(OH)_n$  をラットの尾静脈に注入し、1時間後と24時間後の臓器切片をイメージング質量分析することにより、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。また質量数 720 m/z ( $C_{60}$  の質量) の統計学的解析 (受信者動作特性、主成分分析) も取り入れ、臓器内に  $C_{60}(OH)_n$  が存在することの実証を目的とした。

## B. 研究方法

精製された  $C_{60}(OH)_n$  を生理活性水により濃度 3.0 mg/mL に調製し、1.0 mL をウイスターラットの尾静脈から注入した (合計3個体)。コントロールは生理食塩水 1.0 mL をウイスターラットの尾静脈から注入した。1時間後および24時間後に各臓器 (脳、肺、肝臓、腎臓) を摘出し、凍結切片を作製し、ITO コーティングスライドガラスに固定した。これら切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトルを

測定した。MALDI-TOF-MS には、これまで  $N_2$  レーザーを使用していたが、本年度は高分解能の質量イメージング像を得るために、イオン化レーザーの開発を行い、固体レーザー (SmartBeam; 200 Hz) を装備した autoflex III (Bruker Daltonics) を使用した。測定モードは、Negative Reflector mode とした。試料プレートには、MTP Slide-Adapter (#221499 Bruker Daltonics) を使用した。画像解析・解析は flexImaging 2.1 (解像度 100  $\mu\text{m}$ ) を用いた。

## C. 研究結果

### C-1. イオン化レーザーの開発

イメージングの空間分解能を向上させるためには、イオン化で使用するレーザーのビーム径を小さく、かつ高周波でイオン化を行う必要がある。これまで使われている  $N_2$  レーザーはビーム径が大きく、低周波数であることに問題があった。一方、YAG レーザーはビーム径と繰り返し周波数は申し分ないが、測定試料の消費が激しく生体試料の質量イメージングに適していなかった。今回開発した固体レーザー (SmartBeam) は Nd:YAG レーザーを改良することにより、測定試料の消費が激しくない特性を持ち合わせ、かつビーム径の小さい、高周波数の、質量イメージングに適したレーザーである。図1は質量イメージングの1スポットから得られる積算ピーク強度である。SmartBeam からの強度が最も強いことがわかる。このレーザーを使用したイメージング像 (図2) に示す。この基板は、一面に 1297 Da の分子量を持つ分子が満遍なく堆積されており、「E」という文字部分だけマスキングされて分子が堆積されていない。左図は光学顕微鏡像、右図は 1297 Da の分子量で測定した質量イメージマッピング像である。レーザースポットサイズは約 10  $\mu\text{m}$  であり、ターゲットプレート移動ステップは 5  $\mu\text{m}$  である。「E」という文字部分がはっきりと確認されていることから、高分解能で観察されていることが確認できる。以下の  $C_{60}(OH)_n$  を注入したラットの各臓器切片の質量イメージマッピングは、イオン化レーザーを SmartBeam で行った結果である。

### C-2. $C_{60}(OH)_n$ を注入したラットの各臓器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 3a~3d は  $C_{60}(OH)_n$  を注入したラットの1時間

後および24時間の脳、肺、肝臓、腎臓の切片(上段)、及びコントロールの切片(下段)の質量イメージマッピングである。1時間後および24時間後の脳、肺、腎臓の質量イメージマッピングでは、いずれも720 m/zにC<sub>60</sub>(質量数720)に相当するピークが検出されなかった。1時間後の肝臓切片の質量イメージマッピングでは、720 m/zにC<sub>60</sub>に相当する質量スペクトルを検出するものの、ノイズとの差が大きくないため、C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>が肝臓内に存在すると断言できなかった(図4)。これは3個体とも同様の結果であった。一方、24時間後の肝臓切片の質量イメージマッピングから、720 m/zにC<sub>60</sub>に相当するイメージング、質量スペクトルを検出した(図5)。さらに、フラレン構造が壊れるときの特有なフラグメント C<sub>2</sub> (24 Da) ロスも確認されたことから(図6)、肝臓にC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>が存在することが示唆される。また切片内でのイメージングポイントの質量スペクトルを調べたところ、イメージングポイントでは720 m/z (C<sub>60</sub>の質量数720)にピークが現れ、イメージングされていない場所は720 m/zにピークが現れていない(図7)。C<sub>60</sub>の有無が適切にイメージングされており、切片内のC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>の分布を可視化していることがわかる。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。

C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>を注入したラットの24時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングにおいて、質量数720 m/z (C<sub>60</sub>の質量)の統計学的解析を行った。図8は、質量数720での受信者動作特性曲線(ROC曲線)のプロットである。受信者動作特性曲線は縦軸を真の陽性率(敏感度)、横軸を偽陽性率(1-特異度)としたプロットした尺度曲線であり、プロットが左上隅にあるほど、対象値の精度が高く優れていると判断される。プロットからも、C<sub>60</sub>(720 Da)の存在を優位差として認識された。また投与サンプルとコントロールの主成分分析(PCA; principal component analysis)のローディングプロットを示した(図9)。質量数720がアウトライアとして認識されていることから、C<sub>60</sub>が肝臓組織に元々存在しないものであることを示している。これらの統計処理解析からも、確かにC<sub>60</sub>が肝臓に存在することが示唆された。以上から、TOF-MS質量イメージングを用いることより、C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>を注入した24時間後のラットの肝

臓でのC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>の存在を確認した。

## D. 考察

今回の実験では、C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>を注入してから1時間後では、C<sub>60</sub>の質量スペクトルがノイズと区別がつかず、C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>が存在することを明確に断言できなかった。一方で、24時間後には肝臓にC<sub>60</sub>が検出され、C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>が滞留していることがわかる(この結果は3個体とも同様であったため、個体差はない)。昨年度の実験では、1時間後の肝臓にC<sub>60</sub>が検出され、24時間後には肝臓にはC<sub>60</sub>が検出されず、異なる結果となった。現段階では、異なる結果の詳しい原因がわからないが、サンプルの微妙な分散状態(凝集状態)が異なるためだと考えられる。一方、昨年度と今年度の実験から、1時間後と24時間後ではC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>が脳、肺、腎臓には滞留していないことが明らかになった。質量イメージマッピングの分解能に依存するが、非常に少量のC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>が滞留している場合、質量イメージマッピングが困難であるため、検出できなかった可能性もある。今後は、マウス体内の高溶解度C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>の可視化、オオクチバスなどの体内全体のC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>の可視化を行い、代謝機能を行う必要がある。

## E. 結論

ラットに濃度3.0 mg/mLのC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>を1.0 mL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<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>の各臓器(脳、肺、腎臓、肝臓)に対するC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>の可視化を行った。C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>を注入したラットの1時間後の肝臓切片の質量スペクトルから、C<sub>60</sub>(質量数720)に相当するピークが明確に検出されなかったが、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から、C<sub>60</sub>に相当するピークを検出し、また肝臓切片のすべての場所にC<sub>60</sub>がイメージングされていることから、C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>が満遍なく肝臓に存在することが明らかになった。さらにC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>を注入したラットの24時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングにおいて、質量数720での受信者動作特性曲線を描いた結果、優位差のある曲線が得られ、確かにC<sub>60</sub>が肝臓に存在することが示唆された。また主成分分析における投与サンプルとコントロールのローディングプロットでも、質量数720がアウトラ

イアとして現れていることから、 $C_{60}$  が肝臓組織に元々存在しないものであることを示し、 $C_{60}(\text{OH})_n$  が肝臓にあることが示された。このことから取扱いが困難な放射性物質をラベリングせずに、TOF-MSを用いたイメージング質量分析により、 $C_{60}(\text{OH})_n$  の臓器内の可視化に成功した。

## 文献

- 1) W. A. Scrivens, J. M. Tour, K. E. Creek, L. Pirisi, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4517-4518, (1994).
- 2) 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).
- 3) D. W. Cagle, S. J. Kennel, S. Mirzadeh, J. M. Alford, L. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 5182-5187, (1999).
- 4) P. Rajagopalan, F. Wudl, R. F. Schinazi, F. D. Boudinot, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2262-2265, (1996).
- 5) 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).
- 6) E. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1058-1062 (2004).
- 7) S. Yamago, H. Tokuyama, E. Nakamura, K. Kikuchi, S. Kananishi, K. Sueki, H. Nakahara, S. Enomoto, F. *Chem. Biol.*, **2**, 385-389, (1995).
- 8) Y. Sato, K. Tohji, B. Jeyadevan, "Composition controlled synthesis of fcc-FePt nanoparticles using a modified polyol process", *J. Mater. Sci.*, **43**, 2402-2406 (2008).
- 9) T. Arai, S. Senda, Y. Sato, H. Takahashi, K. Shinoda, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Cu-Doped ZnS Hollow Particle with High Activity for Hydrogen Generation from Alkaline Sulfide Solution under Visible Light", *Chem. Mater.*, **20**, 1997-2000 (2008).
- 10) S. Samukawa, Y. Ishikawa, K. Okumura, Y. Sato, K. Tohji, T. Ishida, "Damage-free surface treatment of carbon nanotubes and self-assembled monolayer devices using a neutral beam process for fusing top-down and bottom-up processes", *J. Phys. D*, **41**, 24006(1)-24006(6) (2008).
- 11) Y. Sato, A. Yokoyama, T. Kasai, S. Hashiguchi, M. Ootsubo, S. Ogino, N. Sashida, M. Namura, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, "In vivo rat subcutaneous tissue response of binder-free multi-walled carbon nanotube blocks cross-linked by de-fluorination", *Carbon*, **46**, 1927-1934 (2008).
- 12) Y. Sato, K. Hasegawa, Y. Nodasaka, K. Motomiya, M. Namura, N. Ito, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Reinforcement of rubber using radial single-walled carbon nanotube soot and its shock dampening properties", *Carbon*, **46**, 1509-1512 (2008).
- 13) Y. Sato, M. Ootsubo, G. Yamamoto, G. Van Lier, M. Terrones, S. Hashiguchi, H. Kimura, A. Okubo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, T. Hashida, K. Tohji, "Super-robust, lightweight, conducting carbon nanotube blocks cross-linked by de-fluorination", *ACS Nano*, **2**, 348-356 (2008).
- 14) M. Namura, I. Waki, Y. Sato, G. Yamamoto, A. Okubo, H. Kimura, N. Osaka, K. Motomiya, T. Hashida, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Preparation and characterization of lanthanum carbide encapsulated carbon nanocapsules soot / lanthanum hexaboride nanocomposites", *Mater. Lett.*, in press (2009).
- 15) M. Namura, Y. Sato, N. Sashida, S. Ogino, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, "Characterization of Silver Nanoparticle-Decorated Single-Walled Carbon Nanotube Films", *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.*, in press (2009).
- 16) M. Suto, Y. Hirota, H. Mamiya, A. Fujita, R. Kasuya, K. Tohji, B. Jeyadevan, "Heat dissipation mechanism of magnetite nanoparticles in magnetic fluid hyperthermia", *J. Magn. Magn. Mater.*, in press (2009).
- 17) B. Aıssa, Z. Hamoudi, H. Takahashi, K. Tohji, M. Mohamedi, M. A. E. Khakani, "Carbon Nanohorns-Coated Microfibers for use as Free-Standing Electrodes for Electrochemical Power Sources", *Electrochem. Commun.*, in press (2009).
- 18) 佐藤義倫, "カーボンナノチューブの表面改質に関わる細胞毒性", *Material Stage*, **7**, 98-105 (2008).
- 19) 田路和幸, "カーボンナノチューブの切断と長さ制御", *最新フィルター技術全集*, 95-107 (2008).
- 20) 名村 優, 佐藤義倫, 田路和幸, "カーボンナノチューブの長さ制御", *粉体技術*, **1**, 44-50 (2009).

## 2. 学会発表

1. Y. Sato, M. Ootsubo, G. Yamamoto, G. Van Lier, M. Terrones, S. Hashiguchi, H. Kimura, A. Okubo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, T. Hashida, K. Tohji, "Carbon Nanotube Blocks Cross-Linked by

- De-fluorination”, ChemOnTubes 2008, International meeting on the chemistry of nanotubes: science and applications, Book of abstract P129, Zaragoza, Spain, 2008. 4. 7.
2. M. Namura, N. Sashida, Y. Sato, K. Motomiya, Y. Udagawa, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Decoration of Silver Nanoparticles to Single-Walled Carbon Nanotubes”, ChemOnTubes 2008, International meeting on the chemistry of nanotubes: science and applications, Book of abstract P130, Zaragoza, Spain, 2008. 4. 7.
  3. Y. Sato, I. Waki, M. Namura, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Solidification of Lanthanum Carbide-Encapsulating Carbon Nanocapsule/LaB6 composites”, ChemOnTubes 2008, International meeting on the chemistry of nanotubes: science and applications, Book of abstract P131, Zaragoza, Spain, 2008. 4. 7.
  4. Y. Sato, A. Yokoyama, T. Kasai, S. Ogino, N. Sashida, S. Hashiguchi, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Biocompatibility of binder-free multi-walled carbon nanotube blocks cross-linked by de-fluorination against subcutaneous tissue of rats *in vivo*”, International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes (ISNT2008), Abstract P33, Sapporo, Japan, 2008. 6. 16.
  5. N. Sashida, Y. Sato, M. Namura, S. Hashiguchi, K. Motomiya, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Multi-walled carbon nanotube blocks cross-linked by de-fluorination”, International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes (ISNT2008), Abstract P71, Sapporo, Japan, 2008. 6. 16.
  6. Y. Sato, A. Yokoyama, T. Kasai, S. Hashiguchi, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Tissue response of multi-walled carbon nanotube blocks cross-linked by de-fluorination against subcutaneous tissue of rats *in vivo*”, CNBMT08 Satellite Symposium: 1st Carbon Nanotube Biology, Medicine & Toxicology, Abstract P11, Montpellier, France, 2008. 6. 28.
  7. Y. Sato, M. Ootsubo, G. Yamamoto, G. Van Lier, M. Terrones, S. Hashiguchi, H. Kimura, A. Okubo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, T. Hashida, K. Tohji, “Robust, Lightweight, Conducting Multi-Walled Carbon Nanotube Blocks Cross-Linked by De-fluorination”, NT08: 9th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, Abstract P445, Montpellier, France, 2008. 7. 4.
  8. N. Sashida, N. Namura, Y. Sato, K. Motomiya, Y. Udagawa, B. Jeyadevan, K. Tohji, “Decoration of Silver Nanoparticles to Single-Walled Carbon Nanotubes”, NT08: 9th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, Abstract P453, Montpellier, France, 2008. 7. 4.
  9. Y. Sato, G. Yamamoto, G. Van Lier, M. Terrones, S. Hashiguchi, A. Okubo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, T. Hashida, K. Tohji, “Binder-free Carbon Nanotube Blocks Cross-Linked by De-fluorination”, The 10th International Symposium on Multiscale, Multifunctional and Functionally Graded Materials, Book of Abstract P53, Sendai, Japan, 2008. 9. 23.
  10. Y. Sato, S. Suzuki, K. Motomiya, B. Jeyadevan, A. Yokoyama, K. Tohji, “Cell Growth of Osteoblasts on Carbon Nanotubes”, IUMRS-ICA2008, Program book P152, Nagoya, Japan, 2008. 12. 9.
  11. 佐藤義倫, “あなたの使っているカーボンナノチューブの完全性は大丈夫?”, 日本金属学会 2008 年春季大会 講演概要, P307, 東京都, 千代田区 2008. 3. 24.
  12. 佐藤義倫, “単層カーボンナノチューブの完全性評価法, および生体内でのカーボンナノチューブの構造安定性”, CREST 生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術「カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測」第4回中山チーム全体ミーティング, 山形県, 山形市 2008. 6. 3.
  13. 佐藤義倫, 横山敦郎, 笠井孝夫, 橋口慎二, 本宮憲一, B. ジャヤデワン, 田路和幸, “*in vivo* によるラット軟組織に対する脱フッ素化法による多層カーボンナノチューブブロックの組織反応”, 第35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, P204, 東京都, 目黒区 2008. 8. 29.
  14. 指田直樹, 佐藤義倫, 名村 優, 本宮憲一, バラチャンドラン ジャヤデワン, 田路和幸, “高密度垂直配向単層カーボンナノチューブの合成”, 資源・素材2008 講演要旨集, P186, 宮城県, 仙台市 2008. 10. 8.
  15. 名村 優, 指田直樹, 佐藤義倫, 荻野真一, 本宮憲一, バラチャンドラン ジャヤデワン, 田路和幸, “銀ナノ粒子/SWCNT コンポジット膜のキャラクターゼーション”, 資源・素材2008 講演要旨集, P15, 宮城県, 仙台市 2008. 10. 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

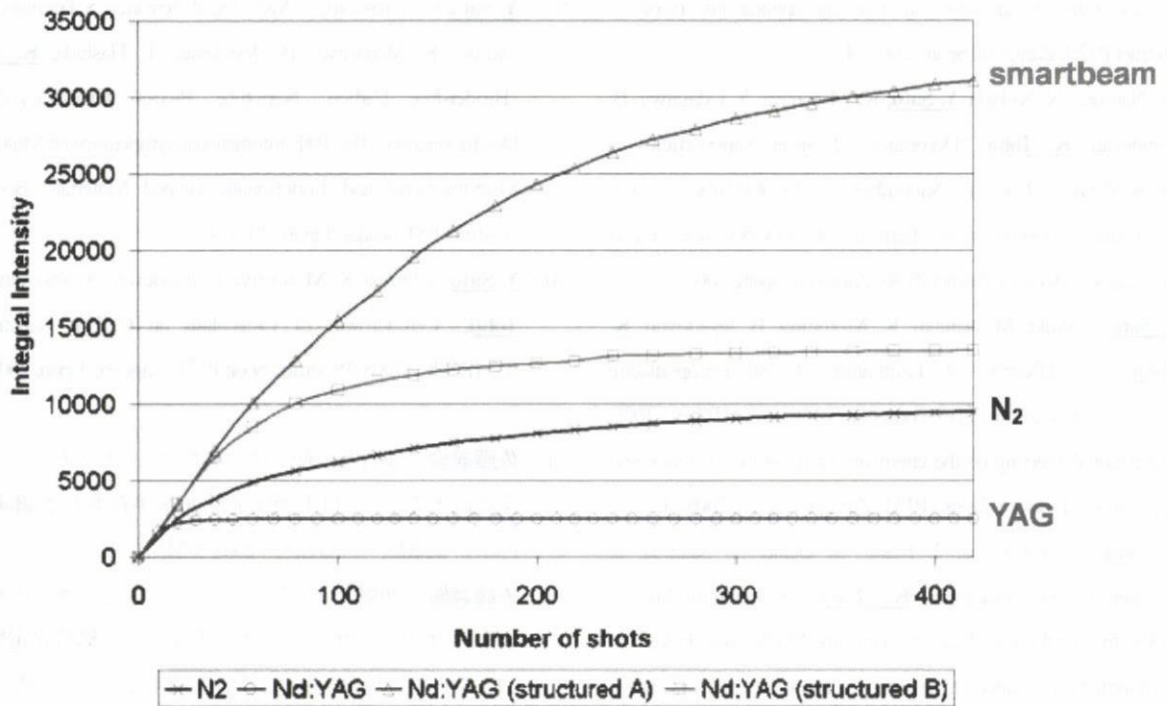
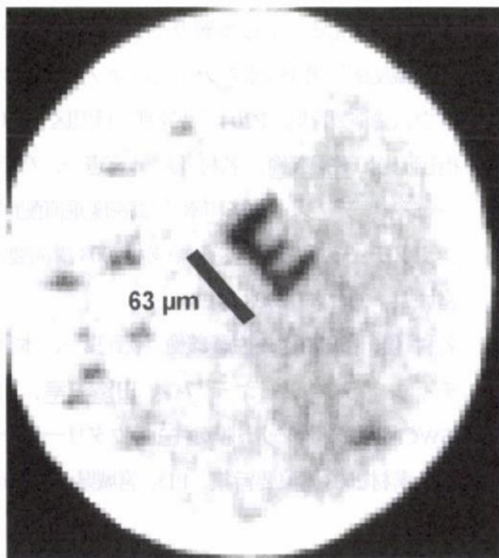
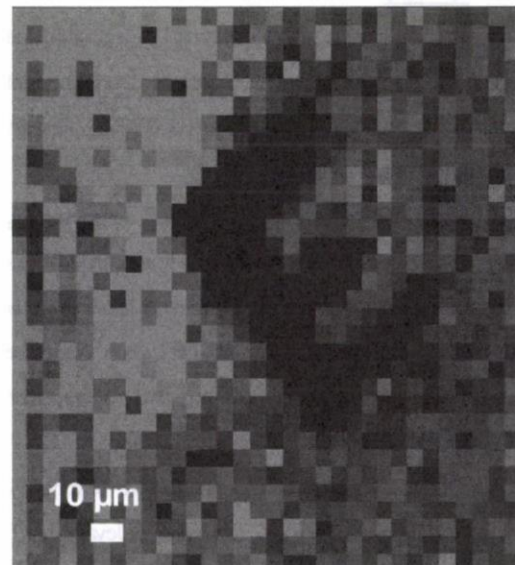


図1 質量イメージングの1スポットから得られる積算ピーク強度.



**Microscopic Image**

63 μm letter burned  
into 400 μm PAC calibration spot.



**MALDI Image (m/z 1297 Da)**

SmartBeam  
Laser spot size about 10 μm  
Step size 5 μm

図2 SmartBeamを使用したイメージング像。光学顕微鏡像(左)、質量イメージングマッピング像(右)。レーザー照射スポット径: 最小 10 μm、ターゲットプレート移動ステップ: 最小 5 μm。



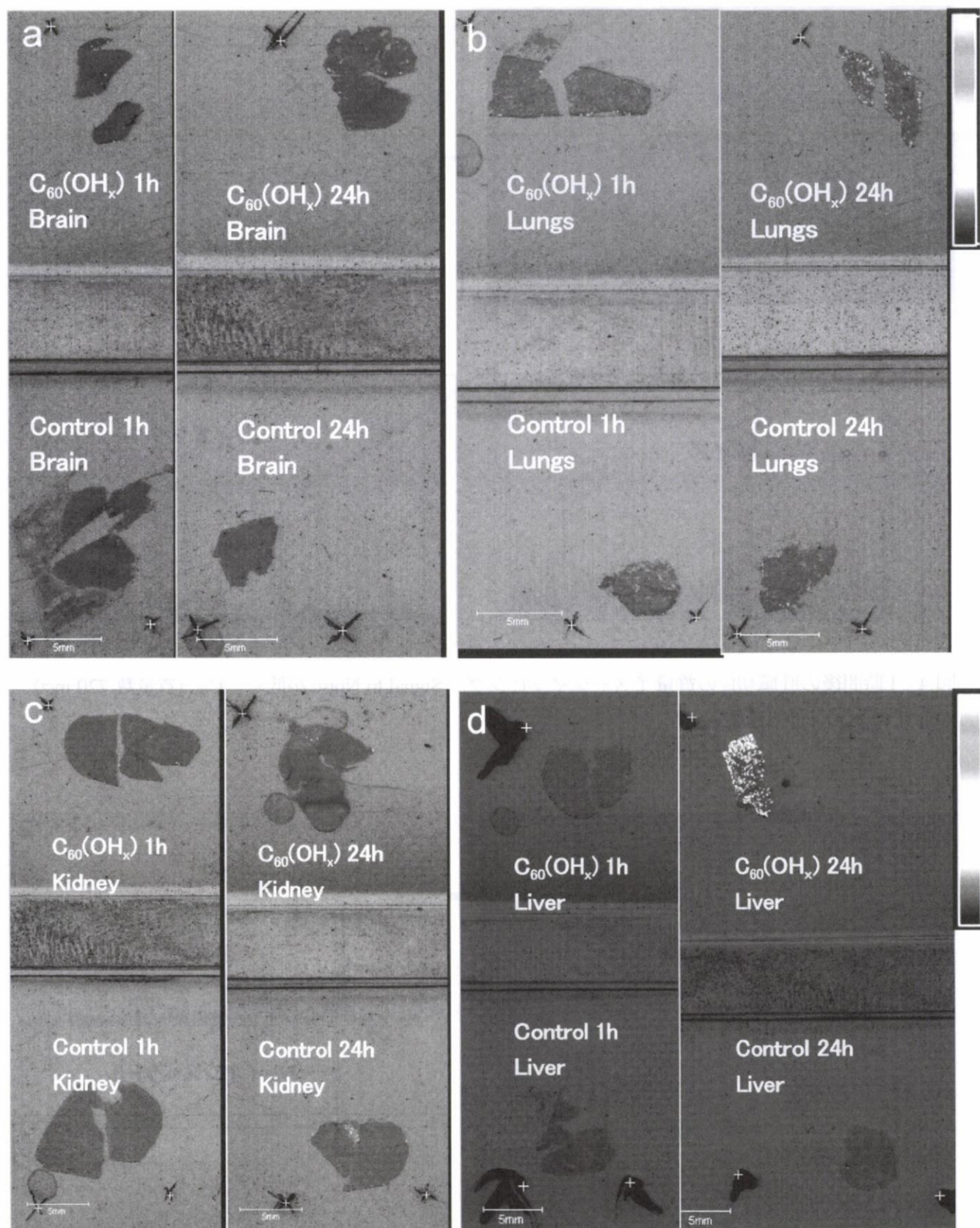


図3  $C_{60}(OH)_n$ を注したラットの1時間後および24時間後の脳 (a)、肺 (b)、腎臓 (c)、肝臓 (d)の切片の質量イメージマッピング。  $C_{60}(OH)_n$ 埋入組織切片 (下)、コントロール (上)。

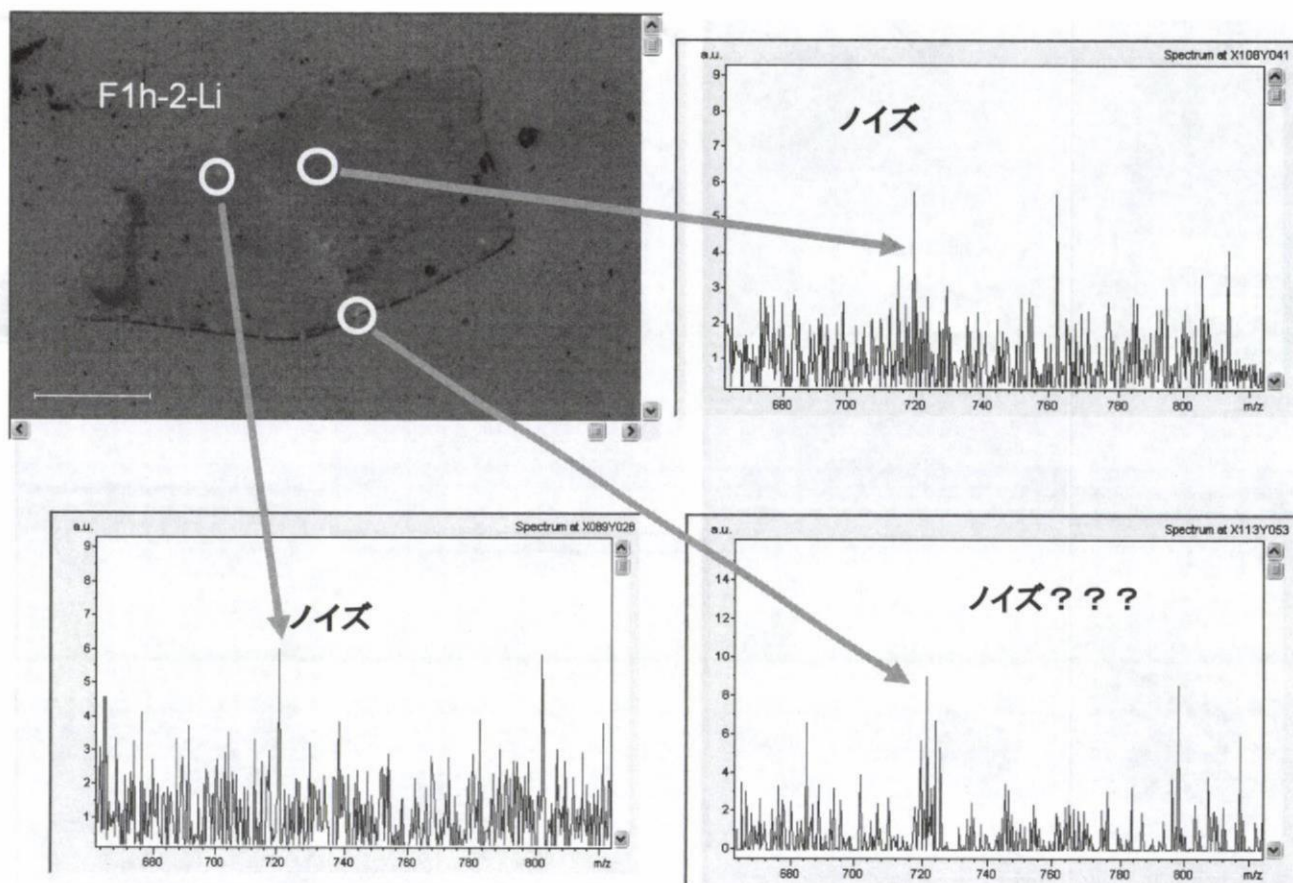


図4 1時間後の肝臓切片の質量イメージマッピング。Signal to Noiseが低く、 $C_{60}$  (質量数 720 m/z) が存在すると断言できない。

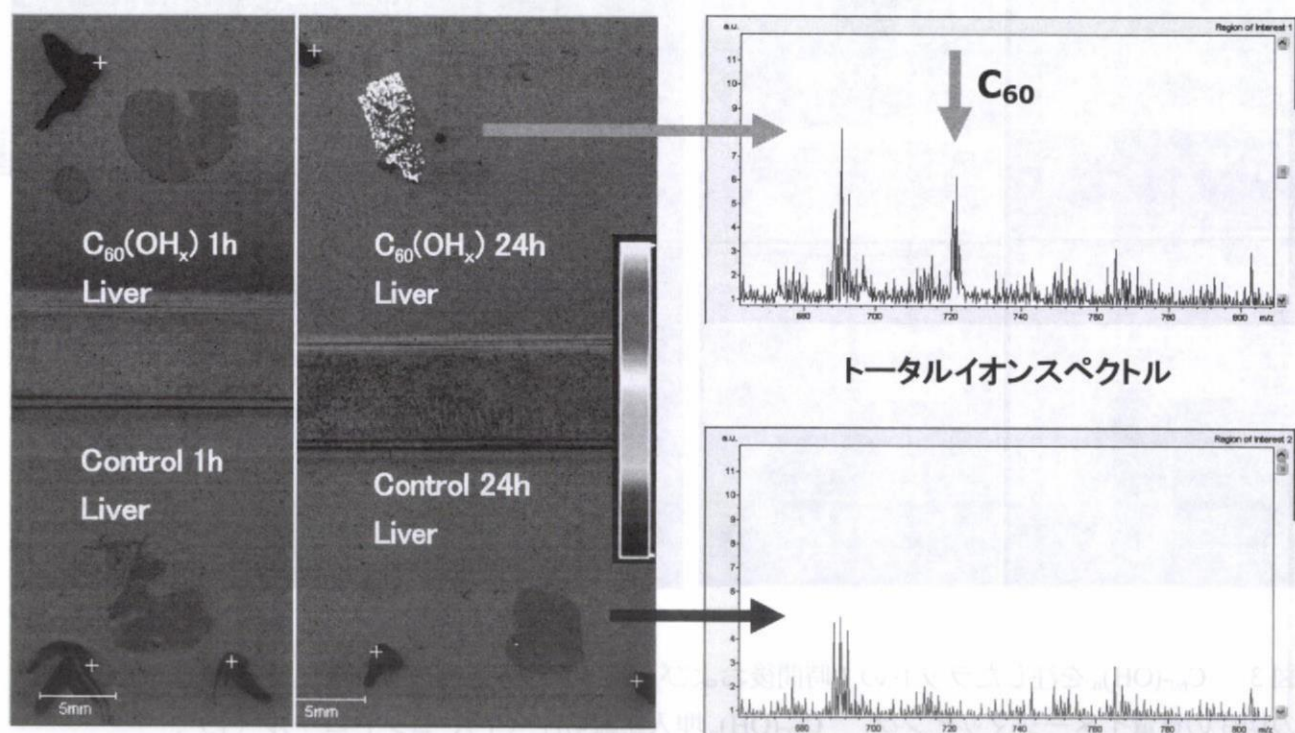


図5  $C_{60}(OH)_n$ を注したラットの24時間後の肝臓切片の質量イメージマッピングと質量スペクトル。

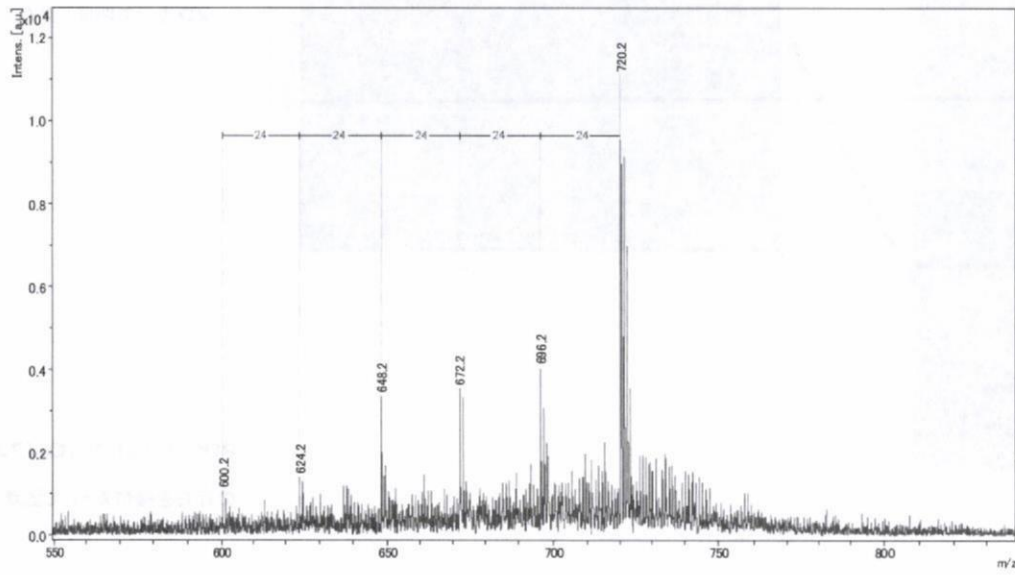


図6  $C_{60}-(OH)_n$ を注したラットの24時間後の肝臓切片の質量スペクトル。 $C_2$ ロスが観測される。

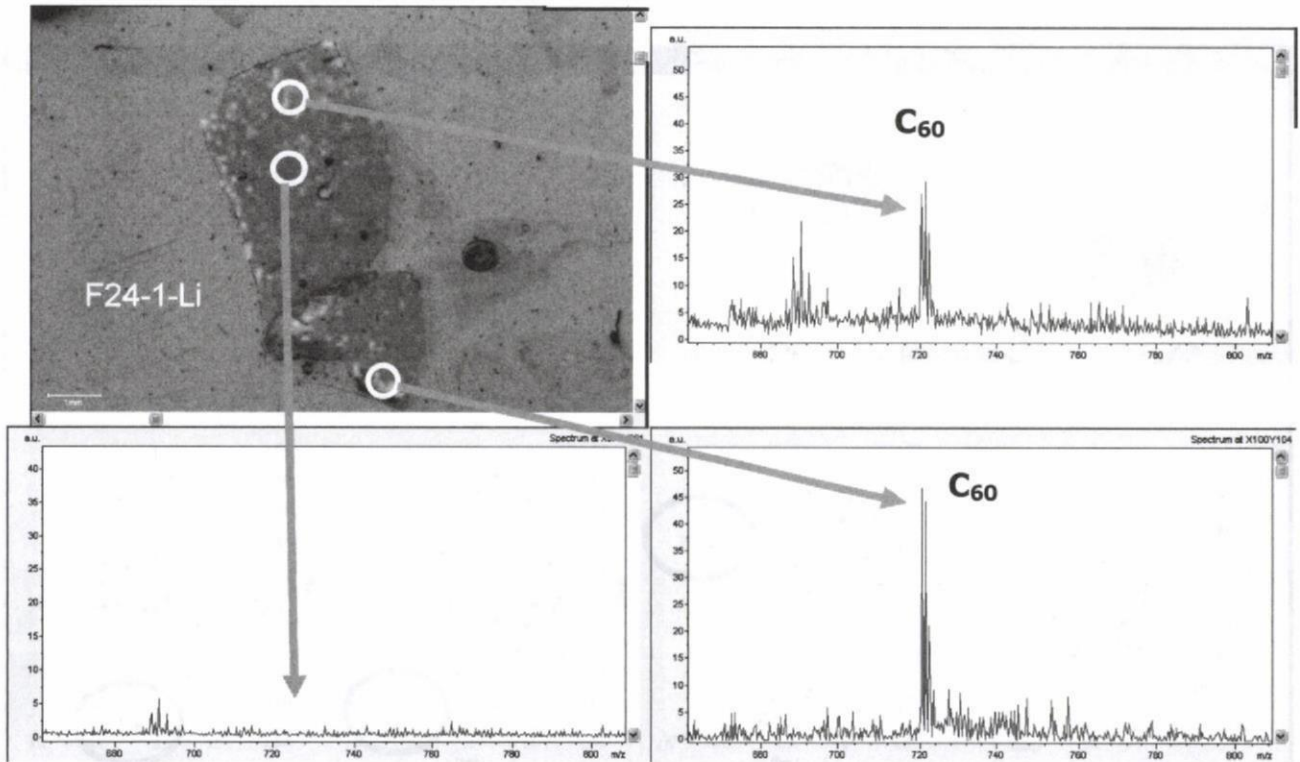


図7  $C_{60}-(OH)_n$ を注したラットの24時間後の肝臓切片の質量イメージマッピングとそのイメージングポイントの質量スペクトル。

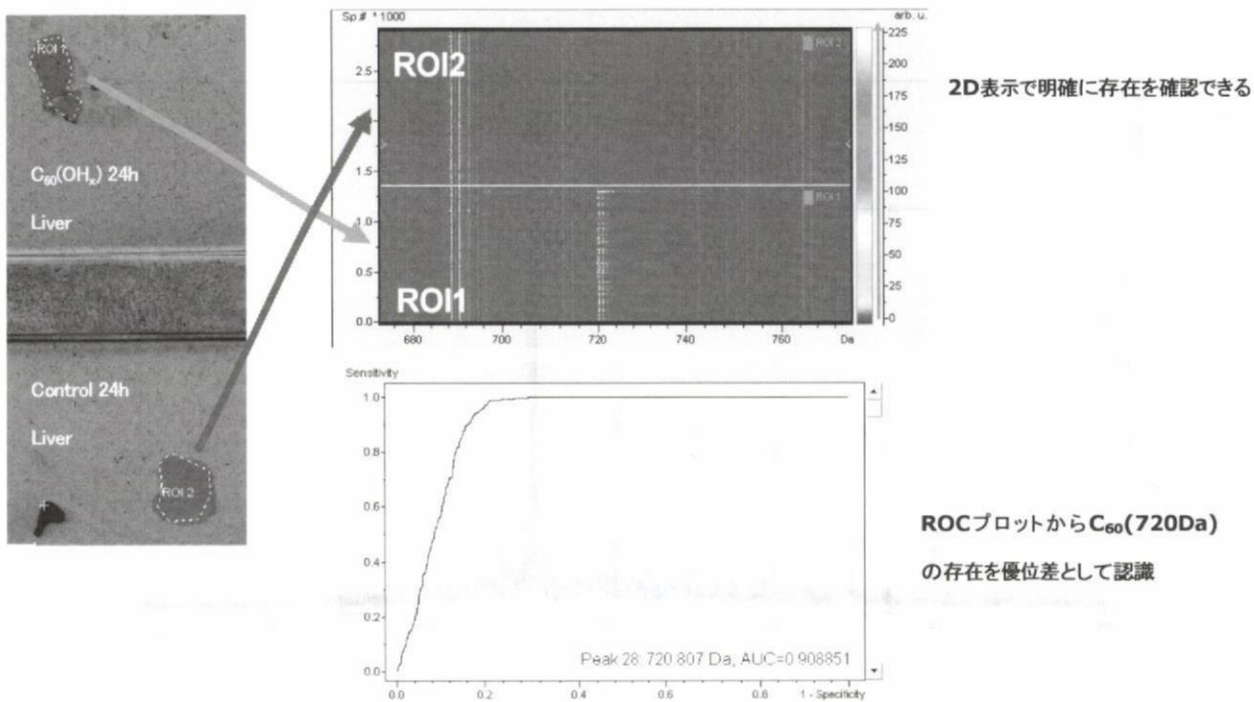


図8  $C_{60}(\text{OH})_n$ を注入したラットの24時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングにおいて、質量数720での受信者動作特性曲線（ROC曲線）。

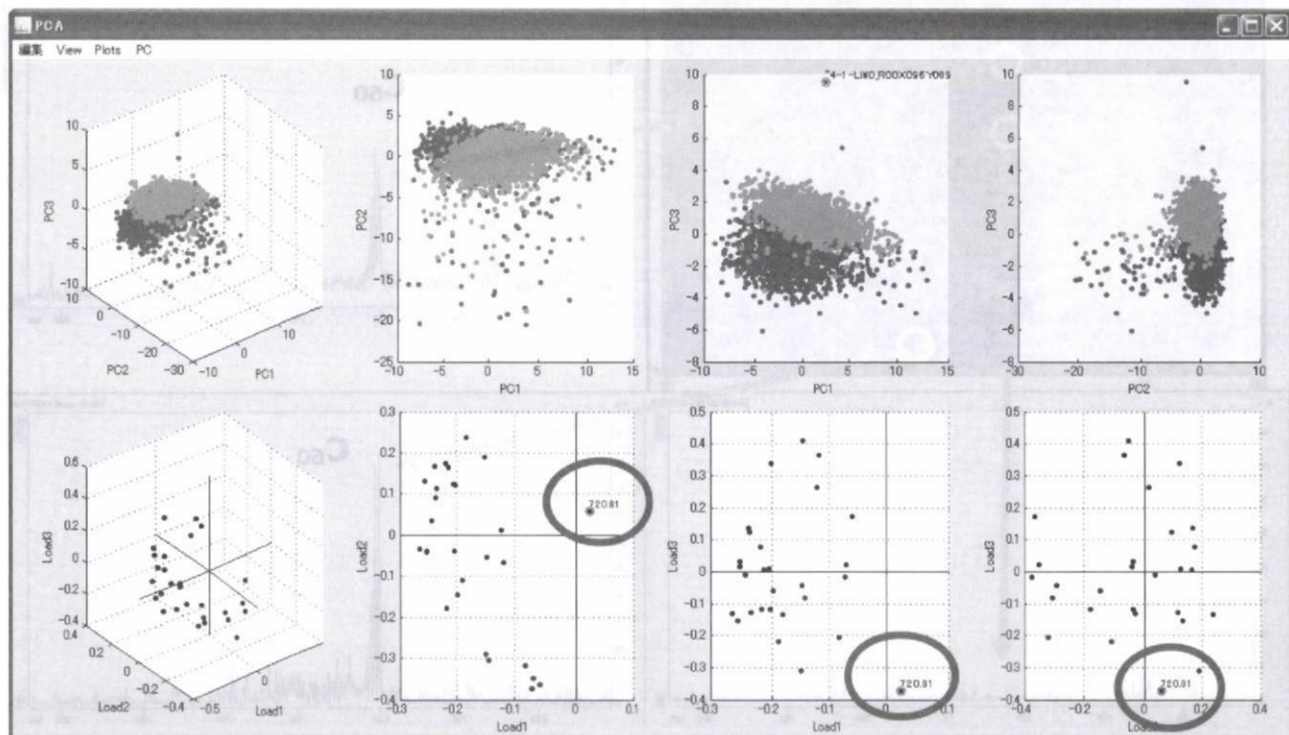


図9  $C_{60}(\text{OH})_n$ を注入したラットの24時間後の肝臓の切片の投与サンプルとコントロールの主成分分析（PCA）。ローディングプロット中にある質量数720 m/zがアウトライアとして現れていることから、 $C_{60}$ が肝臓組織に元々存在しないものであることを示している。

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	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	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准教授
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。昨年に引き続き、生体反応として、各種カーボンナノ物質の皮下組織への埋入後の組織学的、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、従来生体内では構造変化が生じないと考えられていた多層カーボンナノチューブも1年以上長期埋入により、外層の結晶構造に変化が生じることが明らかとなった。しかし、2年間埋入後も、腫瘍などの変化は認められなかった。水溶化フラレンは静注1時間後では、脳、肺、肝、腎、脾臓のいずれの組織でも検出されなかったが、24時間後肝臓で検出されたが、脳、肺、脾臓では検出されなかった。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の可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

超高齢化社会が到来し、生活習慣病の危険が叫ばれている現在、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、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。昨年来、海外の著名な科学雑誌をはじめとして、ナノ物質の

環境汚染や生体に対する為害性が報告されているが、一方為害性は少ないという報告もなされており、その解明が期待されている。

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、生体材料への応用を考慮し多層カーボンナノチューブをコーティングしたコラーゲンスポンジの皮下への埋入、さら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  $\mu\text{m}$  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 2.0, 1.2 および 0.4  $\mu\text{m}$  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 1 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、光学顕微鏡用の標本を作製した。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 H800, H700) 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)、さらに超高圧超高分解能電子顕微鏡 (日本電子 JEM-ARM-1300)にて観察した。

### 2. 多層カーボンナノチューブをコーティングしたコラーゲンスポンジのラット皮下への埋入実験

#### 1) 材料

精製・親水化処理した多層カーボンナノチューブ (MWCNTs : 直径 20~50nm, CNT Inc., Korea) を界面活性剤水溶液 (コール酸ナトリウム : 0.1w/v%) に 100ppm になるよう分散させた。同分散液中にコラーゲンスポンジ (3 x 3 x 2mm ; AteloCell®; Koken Co., Ltd) を浸漬し、数時間振とうさせた後、洗浄し多層カーボンナノチューブコートスポンジを作製した。

#### 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。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、多層カーボンナノチューブコートスポンジを埋入した。対照としてコラーゲンスポンジのみを埋入し、術後 1 および 4 週で試料を周囲組織とともに摘出し、パラフィン包埋を行った後、厚さ 5  $\mu\text{m}$  に薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。

### 3. 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

6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（注射用蒸留水）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、北海道大学動物実験委員会の承認を得て、北海道大学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 :

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。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 4-1)。

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。TEM 観察においては、凝集の程度は弱くなる傾向を示し、1 本 1 本の構造が明確に観察されるようになった (図 4-2)。

##### (2)825MWCNTs について

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。通常の 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 4-3)。一方、超高分解能 TEM 観察においては、層状構造に劣化を示す像が観察された (図 4-4)。

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おり、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、大きな MWCNTs 集塊表面には異物巨細胞が観察された。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。超高分解能 TEM においては、MWCNTs の外層が 1 週後に比較し、肥厚する傾向を示し (図 4-5)、さらに最外層の MWCNTs には、構造の変化が観察され、1 週後に比較すると層状構造が不明瞭になっていた (図 4-6)。

#### 2) H-CNFs について

##### (1)600H-CNFs :

埋入 1 年後において、H-CNFs は、脂肪組織内に観察された。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。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 5-1)。

埋入 2 年後においては、H-CNFs 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が、一部には H-CNFs 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。超高分解能 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 5-2)、層状の構造も不明確となっているものも観察された (図 5-3)。

##### (2)1200H-CNFs :

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。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5-4)。超高分解能 TEM においては、積層傘構造の切断を示唆する像も観察された。

## 2. 多層カーボンナノチューブをコーティングしたコラーゲンスポンジのラット皮下への埋入実験

### 1) コラーゲンスポンジ

埋入1週間においては、コラーゲンスポンジは幼弱な肉芽組織で被包されていた(図6-1)。辺縁部のポア内には、毛細血管や線維芽細胞が多数観察され、コラーゲン表面に多角異物巨細胞も観察された(図6-2)。4週間では、コラーゲンスポンジは、吸収され、皮下組織には認められなかった。

### 2) 多層カーボンナノチューブコートスポンジ

埋入1週間においては、コラーゲンスポンジと同様に幼弱な肉芽組織で覆われていた(図6-3)。多層カーボンナノチューブの一部は、コラーゲンスポンジから剥離し、マクロファージに貪食されていた(図6-4)。ポア内には、線維芽細胞とともに多くのマクロファージが観察された。炎症反応は、コラーゲンスポンジに比較しやや強い傾向を示した。

埋入4週間においては、多層カーボンナノチューブコートスポンジは、線維性結合組織に被覆されていた(図6-5)。コラーゲンスポンジは、観察されず、多層カーボンナノチューブが線維や線維芽細胞の間に、規則性のある形で認められた。多くの多層カーボンナノチューブは、マクロファージに貪食されていた(図6-6)。

### 3. フラーレンの生体内分布の検索

静注1時間後の脳、肺、肝臓のMALDI-Imagingを図7-1、2に示す。上段が水溶化フラレンを静注したもの、下段がコントロールである蒸留水を静注したものである。すべての像においてフラレンは検出されていない。静注24時間後のMALDI-Imagingを図7-3に示す。脳、肺、腎臓には1時間後と同様にフラレンは検出されていない。図7-4に、24時間後の肝臓のマッピング像とスペクトルを示す。マッピング像においてフラレンが検出され、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。

## 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。

埋入1年後以降においては、MWCNTsの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週間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週間においては、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。超高分解能TEMにおいても、層状構造の劣化が認められた。このような高分解能TEM観察から、MWCNTsにおいても結晶構造の変化が生じうること



が示唆された。Sp2 構造は安定とされているが、長期間体内に埋入されている状態では、マクロファージ等の細胞の影響を受け、構造の変化が生じるものと推察された。

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。

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。

このような長期間での埋入実験は、ナノ物質の生体に対する影響を検討する上において非常に重要であり、今後形態学的な検索のみならず、生化学的なアプローチを行う必要があるものと考えられる。

## 2. 多層カーボンナノチューブをコーティングしたコラーゲンスポンジのラット皮下への埋入実験について

本実験は、多層カーボンナノチューブの生体材料への応用を考えた基礎実験の一つである。コラーゲンスポンジに比較し皮下組織埋入における炎症反応はやや強い傾向を示したが、経時的に炎症反応は軽微となり、基質化が進行していることが示された。皮下に直接多層カーボンナノチューブを埋入した場合と異なり、光学顕微鏡による観察ではあるが、ほとんどのカーボンナノチューブがマクロファージに貪食されていた。これは、コラーゲンスポンジへのコートが薄く均一になされたということを示唆している。コラーゲンスポンジが完全に吸収された後も、ナノチューブが、一定の規則性のある集塊で認められたが、このこともコーティングが均一になされていることを示唆している。スポンジをナノチューブでコーティングすることによりコラーゲンの強度の向上を図ったが十分な効果は得られなかった。今後のさらなる検討が必要と思われる。

## 3. 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。

ラット尾静脈から水溶性フルーレンを注入24時間後に、肝臓で明確なフルーレンの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。昨年の結果では、静注1時間後に肝臓に検出され、24時間後ではいずれの臓器にも検出されなかった。これらの結果から、フルーレンが肝臓に集積することを明確に示している。

排出の時間が異なった原因として、使用したフラーレンの精製方法や水溶化の方法が考えられ、わずかな化学修飾の差でも排泄に大きく影響することが示唆された。

## 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. コラーゲンスポンジへの多層カーボンナノチューブの薄層かつ均一なコーティングが可能であり、生体材料としての可能性が示唆された。
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. 水溶性フラーレンを静注すると、24 時間後では肝臓に検出されたが、他の臓器には検出されなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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*. 28;1082-1086.2007.
2. Sakaguchi N, Watari F, Yokoyama A, Nodasaka Y "High-resolution Electron Microscopy of Multiwalled Carbon Nanotubes in the Subcutaneous Tissue of Rats". *Journal of Electron Microscopy* (Tokyo).57;159-164,2008.
3. Sato Y, Yokoyama A, Kasai T et al. In vivo Rat Subcutaneous Tissue Response of Binder-Free Multi-Wall Carbon Nanotube Blocks Cross-Linked by De-Fluorination. *Carbon* 46;1927-1934,2008.
4. 平田 恵理:カーボンナノチューブコートしたコラーゲンス

ポンジの3次元培養担体への応用: DE No.168.32-33

5. Eri Hirata, Motohiro Uo, Hiroko Takita, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Atsuro Yokoyama: Development of a 3D collagen scaffold coated with multiwalled carbon nanotubes. *J Biomed Mater Res B; in press*

## 2. 学会発表

1. 平田 恵理, 宇尾 基弘, 横山 敦郎, 亘理 文夫:カーボンナノチューブコートしたコラーゲンスポンジの3次元培養担体への応用.: 第 51 回日本歯科理工学会 (抄) 歯科材料・器械 27:138 (2008.4)
2. Eri Hirata, Motohiro Uo, Hiroko Takita, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Atsuro Yokoyama : Multiwalled carbon nanotube coating of 3D cell culture scaffold. International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (2008.6)
3. Eri Hirata, Motohiro Uo, Hiroko Takita, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Atsuro Yokoyama : 3Dscaffold with carbon nanotube coated collagen sponge. 86th General Session & Exhibition of the IADR. Tronto, Canada (2008.7)
4. 平田 恵理, 宇尾 基弘, 横山 敦郎, 亘理 文夫:カーボンナノチューブコートした3次元培養担体の作製と評価: ナノ粒子の体内動態可視化法の開発 平成 20 年度冬期第 5 回研究成果発表会 (2009. 2)

## 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

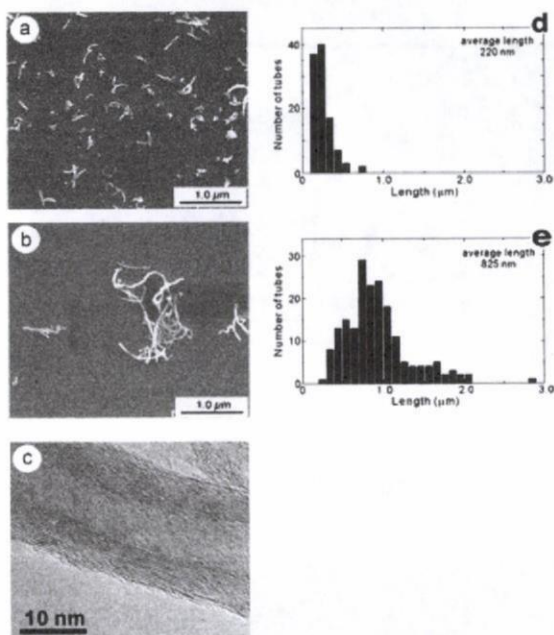


图 1

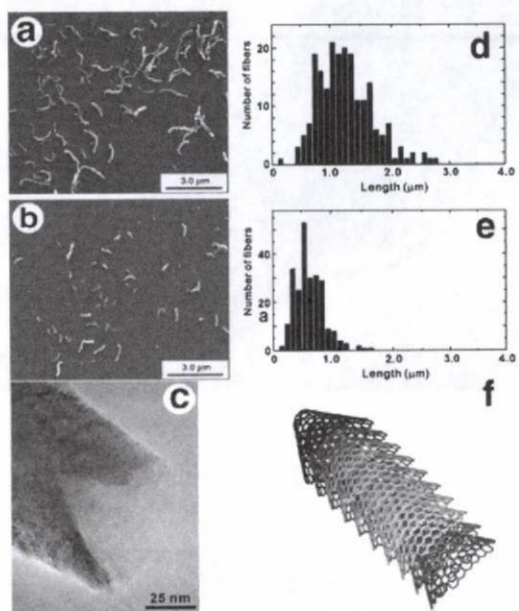


图 2

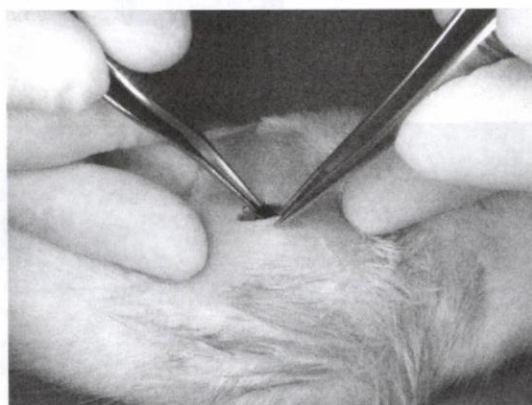


图 3

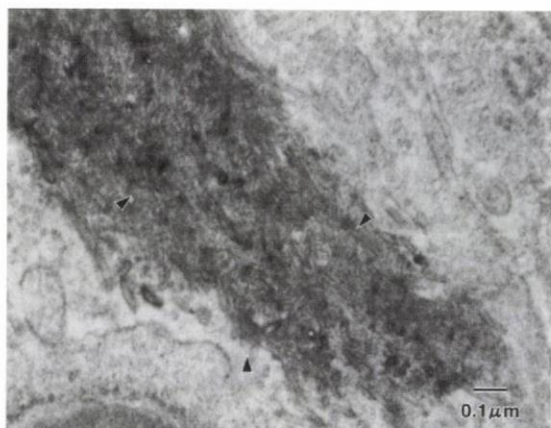


图 4-1

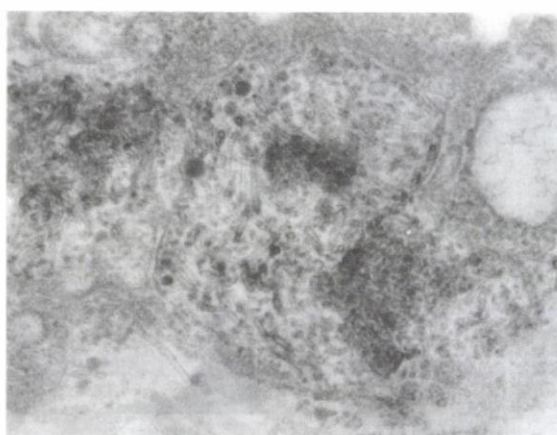


图 4-2

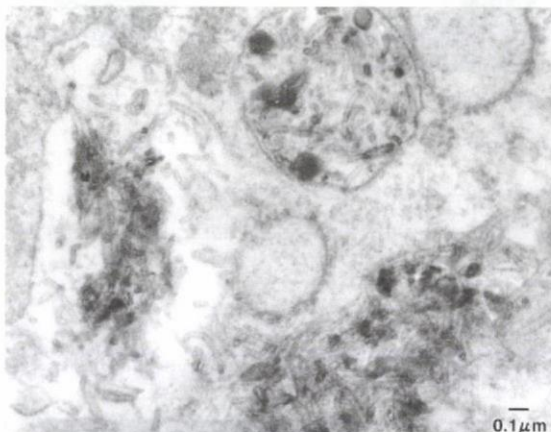


图 4-3

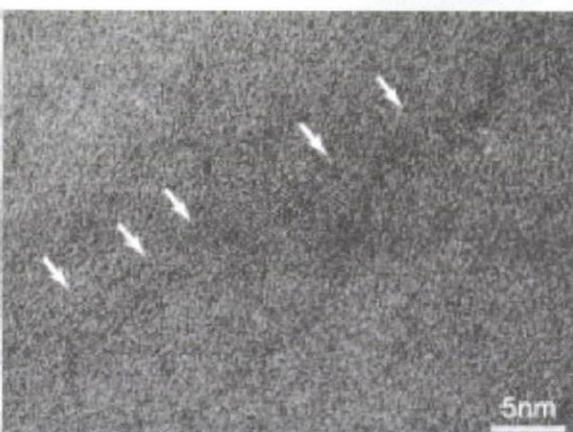


图 4-4

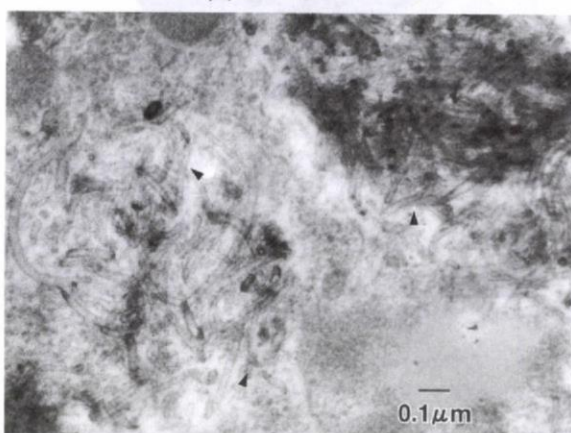


图 4-5

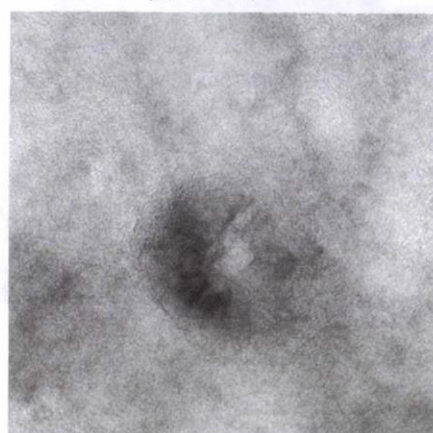


图 4-6