

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

ナノアパタイトの全身動態検索に関する研究

分担研究者 石川邦夫

九州大学大学院歯学研究院教授

研究要旨 本研究においては生体骨の無機主成分がナノ結晶子アパタイトであることに着目し、現在骨補填材として用いられている焼結体アパタイトとナノアパタイトの生体内挙動に関する差異を検討することを目的とした。

これまでに熱力学的安定性の差を利用して溶解析出反応によって前駆体であるナノ結晶子炭酸カルシウムブロックからナノ結晶子炭酸アパタイトを調製した。また、対照である水酸アパタイト焼結体上で破骨細胞を培養しても吸収窩は認められなかったが、炭酸アパタイトブロック上で破骨細胞を培養すると破骨細胞による吸収と見られる吸収窩が認められることを明らかにした。そこで本年度は実験動物を用いて、ナノ結晶子炭酸アパタイトの生体硬組織内反応を検討した。実験動物（ラット）に調製した骨欠損を水酸アパタイト焼結体およびナノ結晶子炭酸カルシウムにて再建した。いずれも優れた組織親和性と骨伝導性をしめした。術後4週目の段階で炎症反応は認められなかった。また、骨欠損部に埋入した水酸アパタイト焼結体およびナノ結晶子炭酸アパタイト周囲は骨に覆われていた。さらに水酸アパタイト焼結体は全く吸収されていなかったが、ナノ結晶子炭酸アパタイトの平均サイズは埋入4週目で約50%となっていた。これらの実験結果から、ナノ結晶子炭酸アパタイトは焼結体水酸アパタイトとは全く異なる挙動を示すこと、破骨細胞によって吸収されるため、骨欠損部で骨に置換される人工骨置換材料となる可能性が高いと結論した。

A. 研究目的

超高齢社会の到来に伴い、骨疾患が急増している。骨欠損治療における第一選択は自家骨移植であるが、自家骨採取に必要な健全部位への二次的手術に伴う侵襲等の重大な問題が不可避である。生体骨の無機主成分はナノ結晶子炭酸アパタイトであり、ナノ結晶子炭酸アパタイトは化学合成できる。しかし、アパタイトは粉末状態で生体組織と接触すると結晶性炎症を惹起するため、粉末では骨補填材として使用できない。無機粉末は焼結によってブロック体に形成することが一般的であるが、ナノ結晶子炭酸アパタイト熱的に不安定であり、焼結に必要な温度では熱分解されてしまう。

1970年代に炭酸アパタイトの熱的不安定性の原因である炭酸基を除去した水酸アパタイトが合成さ

れ、水酸アパタイトが実用化された。

焼結水酸アパタイトは、現在、骨補填材として臨床応用されており、優れた組織親和性と骨伝導性（骨が繊維性結合組織の介在なしに材料と結合する性質）を示す。しかし、焼結水酸アパタイトはナノ結晶子炭酸アパタイトを組成とする自家骨とは異なり生体骨とは置換されない。

本研究においては生体骨と同じナノ結晶子炭酸アパタイトの調製を行った。また人工的に調製したナノ結晶子炭酸アパタイトの全身動態を検討する目的で、破骨細胞に対するナノ結晶子炭酸アパタイトの挙動、実験動物に形成した骨欠損内部におけるナノ結晶子炭酸アパタイトの挙動を検討した。

B. 研究方法

本年度までに確立した方法でナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒を調製した。すなわち、水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露し、前駆体であるナノ結晶子炭酸カルシウムを調製した。得られた前駆体であるナノ結晶子炭酸カルシウムを1モル濃度リン酸アンモニウム水溶液に60℃で14日間浸漬することによってナノ結晶子炭酸アパタイトを調製した。

得られたナノ結晶子炭酸アパタイトは歯骨細胞によって吸収されることがこれまでの研究で確認されているので、骨に置換される可能性が高い。

そこで、実験動物を用いてナノ結晶子炭酸アパタイトの骨置換の有無を検討した。実験動物としてはSDラットを選択した。ラット頭蓋骨に直径8mmの骨欠損を調製した。当該骨欠損を水酸アパタイト焼結体顆粒およびナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒によって再建した。顆粒の粒径はいずれも直径200~400 μm とした。経時的に試料を周囲組織と一塊に摘出し、ホルマリン固定した後に、樹脂包埋し、試料切片を作製して、光学顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果

ラット頭蓋骨に調製した骨欠損を水酸アパタイト焼結体顆粒およびナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒によって再建した場合、埋入術式に起因すると思われる炎症反応以外の炎症所見は1週目までに認められなかった。2週目および4週目の病理組織像からも著名な炎症所見は認められず、いずれも優れた組織反応を示すことがわかった。また、埋入4週目の時点で、水酸アパタイト焼結体顆粒およびナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒の表面にはいずれも骨が伝導されており、ナノ結晶子炭酸アパタイトも水酸アパタイト焼結体と同様に骨伝導性を示すことがわかった。得られた病理組織像から、ナノ結晶子炭酸アパタイトへの骨伝導性が水酸アパタイト焼結体以上である可能性も示唆されたが、今回の実験結果からは有意な差は認められなかった。

骨伝導性においてはナノ結晶子炭酸アパタイトと水酸アパタイト焼結体はほぼ同じ挙動を示したが、ナノ結晶子炭酸アパタイトは骨置換に関しては水酸アパタイト焼結体と異なる挙動をしめした。

埋入2週目の段階で、水酸アパタイト焼結体の形態は埋入段階と全く同じであり、水酸アパタイト焼結体はこの段階で吸収を受けないことがわかった。

一方、ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒は埋入2週目の段階で顆粒周囲の吸収が認められた。吸収の機序は明らかではないが、これまでの破骨細胞を用いた結果から考えて破骨細胞性吸収であると考えられる。

埋入4週目の段階でも同様な結果が得られた。すなわち、水酸アパタイト焼結体の形態は埋入段階と全く同じであり、水酸アパタイト焼結体はこの段階でも吸収を受けないことがわかった。一方、ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒の場合は顆粒周囲の吸収が認められ、吸収の程度は2週目以上であった。4週の段階ではナノ結晶子炭酸アパタイトの周囲に骨が形成されているため、ナノ結晶子炭酸アパタイトは骨に置換される挙動が観測された。

埋入8-12週も同様の挙動を示した。すなわち水酸アパタイト焼結体は埋入時の形態のままで全く吸収所見は認められなかったが、骨伝導性を示し、周囲は骨で覆われた。一方、ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒は経時的に吸収され、また、骨伝導性を示し、周囲は骨で覆われたため、骨に置換される挙動を示した。

図1はナノ結晶子炭酸アパタイトの埋入12週目の病理組織像である。ナノ結晶子炭酸アパタイトは一部が骨内部に残存しているもののほぼ全量が骨に置換されていることがわかる。また、形成された骨組織も成熟していることもわかった。



図1 ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒でラット頭蓋骨に調製した骨欠損を再建した場合の12週目の病理組織像

一方、図2は水酸アパタイト焼結体の埋入12週目の病理組織像である。ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒と異なり、水酸アパタイト焼結体顆粒が残存しており、その形体も埋入時と同じであり、水酸アパ

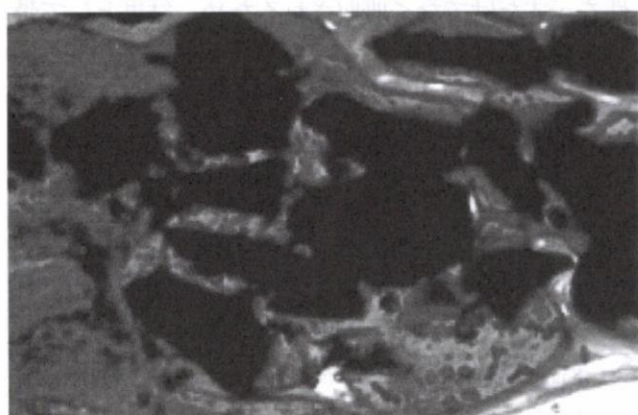


図2 水酸アパタイト焼結体顆粒でラット頭蓋骨に調製した骨欠損を再建した場合の12週目の病理組織像

タイト焼結体の場合は吸収を受けず埋入時の形態を保ったまま残存することがわかった。水酸アパタイト顆粒は骨に直接接触しており、良好な骨伝導性を示すことが確認された。

D. 考察

本研究では実験動物を用いてナノ結晶子炭酸アパタイトの生体内反応性を検討した。ナノ結晶子炭酸アパタイトはナノ結晶子炭酸カルシウムを中間体として熱力学的安定性の差異に基づく溶解-析出反応による組成変換によって調製した。溶解-析出反応による組成変換に必要な要素の一つは適切な溶解度であるが、この条件はナノ結晶子炭酸カルシウムの高い反応によって達成されたと考えられる。ナノ結晶子炭酸アパタイトも高い反応性が期待され、破骨細胞を用いた検討によって水酸アパタイト焼結体は吸収されないのに対し、ナノ結晶子炭酸アパタイトブロックは破骨細胞によって吸収されることがわっている。本年度の実験はこれまでの研究成果を基盤にナノ結晶子炭酸アパタイトの生体内反応性を検討したものである。

図3に示すように骨組織は破骨細胞と骨芽細胞によってリモデリングされている。骨リモデリングに参与している細胞は骨芽細胞と破骨細胞であり、破骨細胞が骨を吸収し、骨芽細胞が新しい骨を形成する。骨芽細胞による骨形成プロセスに関してはアパタイトが骨伝導性を示すことが知られており、ナノ結晶子炭酸アパタイトに対しても問題なく進行すると推測された。今年度実施された実験動物を用い

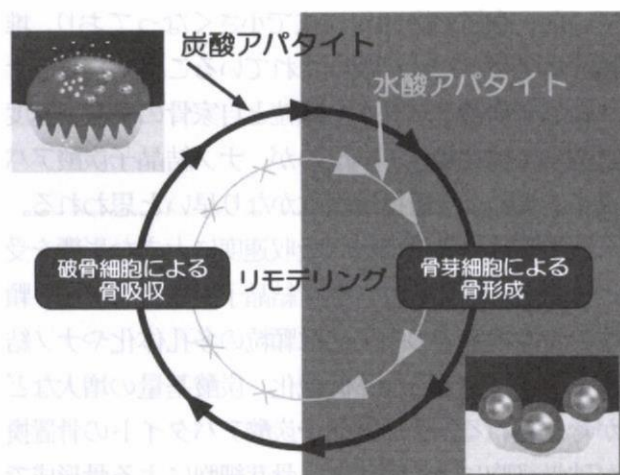


図3 骨リモデリングの概念図

た病理組織学的検討からも水酸アパタイト焼結体顆粒と同様にナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒も骨伝導性を示すことが明らかになった。骨伝導性の程度に関して今回の病理組織学的検討では有意な差が認められなかったが、ナノ結晶子炭酸アパタイトが水酸アパタイトより優れている可能性も示唆された。差異の有無に関しては、より定量的な実験系を構築し確認する必要があると思われるが、ナノ結晶子炭酸アパタイトが水酸アパタイト焼結体より優れた骨伝導性を示すと仮定した場合、想定される原因としてはナノ結晶子炭酸アパタイトが水酸アパタイト焼結体以上に骨芽細胞に親和性があること、破骨細胞の活性化による細胞間伝達によって骨芽細胞が活性化の可能性もある。

一方、骨芽細胞による骨形成プロセスと対局をなす破骨細胞による吸収プロセスは水酸アパタイト焼結体とナノ結晶子炭酸アパタイトで全く挙動が異なることが、先に行った破骨細胞を用いた細胞レベルの実験だけでなく、本年度に行った実験動物を用いた病理組織学的検討においても明らかになった。すなわち、水酸アパタイト焼結体は破骨細胞によって吸収されない。したがって、原理的にも水酸アパタイト焼結体はリモデリングされず骨に置換されない。水酸アパタイト焼結体顆粒の直径は少なくとも埋入12週目まで変化がなく、また形態にも変化が認められなかった。一方、*in vitro*において破骨細胞によって吸収されるナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒は骨欠損内においても破骨細胞によって吸収された。その結果、ナノ結晶子炭酸アパタイトのサイズは埋入時間とともに小さくなり、4週目では約50%になっ

ていた。直径で約50%にまで小さくなっており、堆積計算では87.5%が吸収されていることになる。ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒と自家骨の骨置換速度に関しては比較していないが、ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒の骨置換速度はかなり早いと思われる。

置換速度は破骨細胞の吸収速度に大きな影響を受けることが考えられ、ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒の骨置換速度の向上には顆粒の多孔体化やナノ結晶子サイズのさらなる低減化、炭酸基量の増大などが考えられる。ナノ結晶子炭酸アパタイトの骨置換が破骨細胞による吸収と、骨芽細胞による骨形成であることから顆粒の多孔体化は最も有効であると考えられる。一方で、ナノ結晶子サイズのさらなる低減化、炭酸基量の増大は同一形態における骨置換速度をさらに増大すると考えられ、両者を検討する必要があると思われる。

E. 結論

ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒をラット頭蓋骨に調製した骨欠損部に埋入して、組織反応を検討した。その結果、ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒は炎症反応を惹起することなく、優れた組織反応を示すことがわかった。また、ナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒は水酸アパタイト焼結体顆粒とほぼ同程度の骨伝導

性を示すだけでなく吸収されるため、結果として骨に置換されることがわかった。したがって、ナノ結晶子炭酸アパタイトは自家骨に代わる人工骨置換材として有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Xin Lin, Shigeki Matsuya, Masaharu Nakagawa, Yoshihiro Terada, Kunio Ishikawa: Effect of molding pressure on fabrication of low-crystalline calcite block. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19(2), 479-484, 2008.

2. 学会発表

1. 石川邦夫：生体に学ぶ：炭酸アパタイト骨置換材 日本バイオマテリアル学会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案取得

該当なし

物質動的化学マッピング技術の開発

分担研究者 朝倉清高 北海道大学触媒化学研究センター教授

研究要旨 本研究においては、化学マッピングが可能な X 線光電子放出顕微鏡 (EXPEEM) と X 線励起走査探針顕微鏡 (XANAM) の開発を行った。EXPEE 装置の特徴は、多極子 Wien filter を用いることで、光軸を直線に保ちながら、顕微像を測定し、化学状態を分析できる。この多極子 Wien filter は、内部の電磁場を調整することで、filter の収差を 3 次の項まで補正できるものであり、感度、分解能が向上する。また、放射光のような大型な加速器を必要としないように、実験室規模高輝度 X 線源を作り、これを用いて、元素分析像の取得を行った。さらに、ソフトマテリアル測定のための高感度化に取り組んだ結果、10-100 倍の高感度化に成功した。これを用いて Ni₂P の表面構造の変化を追跡した。また、XANAM 法は、NC-AFM と放射光を組み合わせることで原子レベル元素マッピングを行う未踏技術である。力場測定に成功し、放射光による原子間力場制御のメカニズム解明に道を開いた。

A. 研究目的

DDS をはじめとするナノテクノロジーのバイオ医学応用は 21 世紀高齢社会における個人の健康・QOL 実現に必須の課題である。一方で、その安全性を確認することは重要であり、それに対して必須である体内挙動を解明するために、化学分析可能でかつダメージの少ない X 線光電子放出顕微鏡 (EXPEEM) や X 線励起走査探針顕微鏡 (XANAM) を開発し、ナノ粒子やソフトマテリアルの挙動を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. EXPEEM と SLEEM への展開

光電子放出顕微鏡 (PEEM) は、光を照射し、飛び出す電子を用いて、結像拡大することで、物質の動的移動の画像化をする手法である。しかしながら、化学識別性が小さい。そこで、PEEM と X 線光電子分光法を組み合わせることで、化学的なマッピングをしながら、表面の情報を得る EXPEEM 法の開発

を行った。すなわち、X 線を用いることで、内殻光電子を励起して、表面から外部に取り出させる。このときに、電子の持つ運動エネルギーは、含まれる元素の種類や化学状態により変化するので、この運動エネルギーを分析して、画像化することで、元素の種類や化学状態の分布をナノオーダで知ることができる。この手法をわれわれは EXPEEM (Energy-filtered X-ray photoemission electron microscopy) と呼んでいる。EXPEEM を測定するには、放射光のような大きな加速器を必要とした。また、XPS で通常使われる半球型エネルギー分析器をそのまま使うと、光軸が曲がってしまい、電子顕微鏡の調整には不向きであるという欠点がある。われわれは、図 1 に示すような Wien filter 型エネルギー分析器を用いた EXPEEM 装置の開発を行った。また、汎用されている LEED 装置を簡単に顕微鏡化した SLEEM 装置の開発を行った。

2. XANAM

X-ray を照射しながら非接触原子力顕微鏡 (NC-AFM) を測定すると、X 線吸収端付近で元素特異的に原子間力が変化する。このことを利用した顕微鏡が XANAM(X-ray Aided Non-contact Atomic Force Microscopy; X 線支援非接触原子力顕微鏡) である。図 2 に装置の写真を示す。また、図 3 には測定体系の詳細を示した。

C. 結果

1. Ni₂P の EXPEEM 観察

Ni₂P は、脱硫活性を有する触媒である。その表面の構造は、Ni₃P および Ni₃P₂ という組成を持つ二つの構造が交互に並んで、いることが知られ、両方の面が表面に露出していると言われる。われわれは、それぞれの面の支配面積を PEEM により検討し、それぞれの Ni や P の電子状態の違いを追跡した。

紫外線 2 次電子像

図 4 に紫外線により励起されて飛び出した光電子を拡大結像した PEEM 像を示す。

XPS スペクトル

同じ試料での XPS スペクトルを図 5 に示す。なお、試料にはバイアス電圧として 150 eV 印加されている。従って、光電子本来のエネルギーに比べて 150 eV 分大きな運動エネルギー値となる。(この電圧により、0 eV のエネルギーを持つ 2 次電子が、150 eV のエネルギーを持ってインプットレンズに入射できるようになる。)

2. SLEEM の開発

サンプルの背面に磁石をおき、表面から飛び出す電子を拡大することで、通常の LEED 装置を低速電子顕微鏡に改良できるかしらべた。図 6 に示すように、表面の Cu メッシュ像を 10 倍の拡大率で観測することができた。

3. XANAM 法

力場相互作用の X 線エネルギー依存性測定

図 7 は、周波数シフト Δf でフィードバックをかけたままカンチレバーを Au 領域上に固定し、X 線の入射エネルギーを変えながら試料の垂直方位 Z の信号を計測した結果である。横軸を X 線エネルギー、縦軸を Z 応答信号とした結果を示す。測定条件はカンチレバー共振周波数 f_0 : 114.8 kHz、周波数シフト Δf : -1 Hz、振幅 A_0 : 2.9 nm、また V/F コンバーターの積算時間は 2 s、ゲインは 0.1 MHz/V である。図 7(b) は、別途 Au 薄膜を用いて X 線透過法にて測定した Au L₃ X 線吸収端スペクトルである。ちょうど

X 線吸収端のエネルギー付近において Z 応答信号にピーク状の応答が現れていることがわかる。

Au 蒸着表面でのフォースカーブの X 線エネルギー依存性

図 8 に左横軸に X 線エネルギー、右横軸に表面-探針間距離、縦軸に Δf とした結果を示す。 Δf の距離依存性は Au L₃ 吸収端を境にして変化する事が見いだされた。X 線吸収端前においては、よく観測されるフォースカーブ、すなわち、z が大きい場合には、引力であり、近づくにつれ引力が増大し、極小をとったのち、急激な斥力の増大が観測される。一方、吸収端後では近づくにつれて、引力増大はほんのわずかであり、しかもポテンシャル井戸が浅く、急激に斥力領域に入ってしまうことが観測された。これは、斥力ポテンシャルの変化が起こったためと考えられる。斥力ポテンシャルの変化は吸収端後で広く観察されるものである。

XANAM 像

次に、実際に Au 蒸着表面のトポグラフを観察しながら X 線エネルギーを変化させ、Z 応答がどのように観測されるか調べた。図 9 は NC-AFM 観察中に吸収端前と吸収端後の X 線掃印を繰り返した結果で、X 線エネルギー吸収端位置に縞状の Z 応答が二次元に観測された。このような縞状応答は通常の NC-AFM 像 (図 9 右) にはなく、この有無を利用した元素マッピング法への展開が期待できる。

Ni の XANAM スペクトル

Au の代わりに Ni 薄膜についても、同様の応答があるかどうか調べたところ、図 10 に示すように、Ni の吸収端の直前にピークを与えるような変化を示すことを見いだした。

D. 考察

EXPEEM

これまでに、大幅な感度増大に成功し、今回脱硫触媒として重要な Ni₂P の 2 つの表面構造の PEEM 測定に成功した。Ni₃P と Ni₃P₂ は、仕事関数が異なることが知られている。Ni₃P は 4.75 eV であり、Ni₃P₂ は 5.22 eV である。図 6 の PEEM 像は、5 eV 付近の紫外光で励起したものである。すなわち、5 eV よりも仕事関数が小さいものは明るく、これを超えるものは暗いと推察される。したがって、Ni₃P は右上に生成しており、その大きさは、300 μm 程度の大きさであることがわかる。さらに、それぞれの領域ごとの XPS を測定した。それぞれの領

域ごとの結合エネルギーに大きな変化はなく、電子状態には大きな変化がないと考えられる。

SLEEM

SLEEM は、以下の特徴がある。LEEM は電子回折してくる電子を多段の電子レンズで拡大投影する必要がある。このため、装置は大型化しなければならず、一般的ではない。今回の SLEEM では、サンプル背面に磁場型対物レンズを入れることで、汎用の LEED 装置で、像を拡大し、実像を測定することができたことを示した。これは、こうした簡易型の装置でも LEEM を測定することができることを意味しており、広く普及することが期待される。

XANAM

図 8 や図 10 でわかるように、表面との相互作用は 2 種類からなると考えられる。1 つは吸収端付近の急激に増加する成分と、吸収端に現れるように引力領域がほとんど観察されない部分である。前者量子力学的な結合が関与した相互作用であり、後者は、光電子や 2 次電子放出に伴うチャージによる反発によるものと推測しているが、今後、詳細を検討する必要がある。また、今回 Ni でも測定に成功したことは、他の元素にも拡張できることを強く示唆しており、汎用性の高い手法であるといえる。

E. 結論

ナノ化学顕微鏡である新型 EXPEEM, XANAM を開発し、化学選別像の取得に成功した。今後は本装置で生体等のソフトマテリアルの研究を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Ominami, M. Suzuki, K. Asakura and C.T. Yang, *Growth of CNF on Nanoscale catalyst strip fabricated with FIB*. Nanotechnology. **19**,405302-1-5(2008).
2. K. Kinoshita, G.H. Simon, T. Konig, M. Heyde, H.J. Freund, Y. Nakagawa, S. Suzuki, W. Chun, -J., S.T. Oyama, S. Otani and K. Asakura, *A Scanning Tunneling Microscopy Observation of (root3 x root3) R30 Reconstruction Ni2P (0001)*. Jpn.J.Appl.Phys. **47**,6088-6091(2008).
3. G. Hamasaka, S. Kawamori, A. Ochida, R. Akiyama, K. Hara, A. Fukuoka, K. Asakura, W.J. Chun, H. Ohmiya and M. Sawamura, *Synthesis of SiO2-supported compact phosphines and their application to Rh catalyzed hydrosilylation of hindered ketons with triorganosilanes*. Organometallics. **27**,6495(2009).
4. S. Suzuki, G.M. Moula, T. Miyamoto, Y. Nakagawa, K. Kinoshita,

K. Asakura, S.T. Oyama and S. Otani, *Scanning Tunneling Microscopy and Photoemission Electron Microscopy Studies on Single Crystal Ni2P Surfaces*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. **9**,195-201(2009).

2 学会発表

1. 朝倉清高, *精密表面設計と放射光* 第 101 回触媒討論会, Tokyo, 3.29, 2008
2. 朝倉清高, *Ni リン化合物の表面構造と化学* 太田シンポジウム, 東京, 3/31, 2008
3. Kiyotaka Asakura, Takeshi Miyamoto, Hironobu Niimi, Shushi Suzuki *Chemical Imaging using Energy Filtered X-ray Photoemission Electron Microscopy*, International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes, 2009.6.16
4. K. Asakura, 朝倉清高, *光電子顕微鏡による表面解析*, 早稲田大学, 東京, 2008.
5. K. Asakura, 朝倉清高, *Ni2P 脱硫触媒表面の in-situ 解析*, 早稲田大学, 東京, 2008.
6. K. Kinoshita, 木 久美子, 宮 剛志, 中 雄太, 鈴 秀士, 高 達 朝 清高, *LEED IV 解析による Ni2P(0001)-(1 x 1) 表面構造解析*, 早稲田大学, 2008.
7. T. Miyamoto, H. Niimi, S. Suzuki, S. Takakusagi, K. Asakura, *Photoemission Electron Microscopy Observations of Ni2P (0001) Surface, A New Class of Hydrodesulfurization Catalyst*, Waseda University, Tokyo, 2008.
8. D. Guo, S. Suzuki, S. Takakusagi, K. Asakura, S. Otani, S.T. Oyama, *Surface Structure Study on Ni2P(0001)*, Tokyo Waseda University, 2008.
9. 宮本剛志, 新美大伸, 鈴木秀士, 朝倉清高, *光電子放出顕微鏡による脱硫触媒 Ni2P (0001) 表面のその場観察* 日本化学会北海道支部会, 2008/7/19, 2008
10. 朝倉清高, *光電子顕微鏡による表面解析*, 表面科学会, 東京 早稲田大学, 2008.11.14, 2008
11. 朝倉清高, *放射光を用いた新しい化学顕微鏡の開発*, 札幌 2008.12.13.

G 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
・・・なし・・・
2. 実用新案取得
・・・なし

数分で測定可能

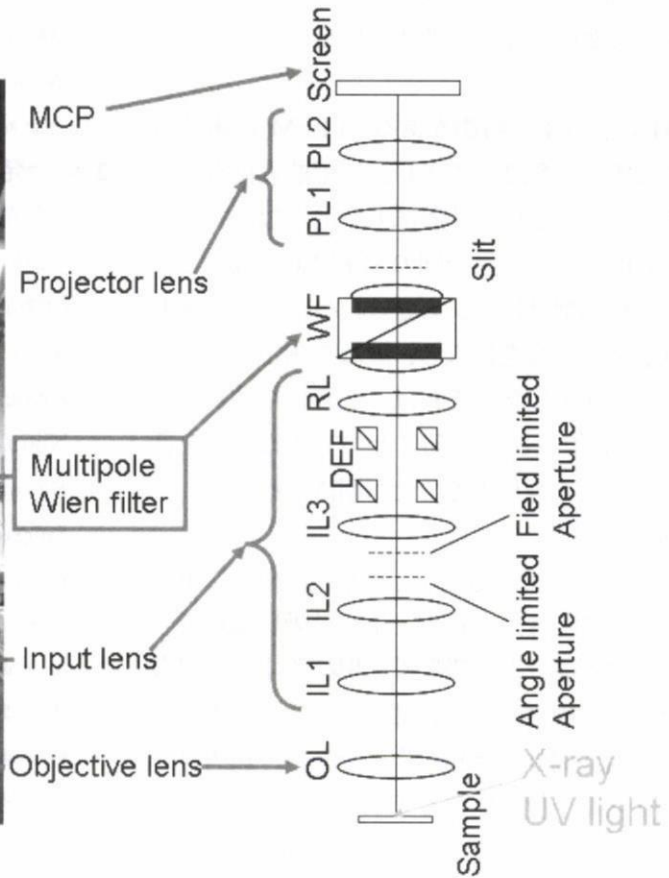
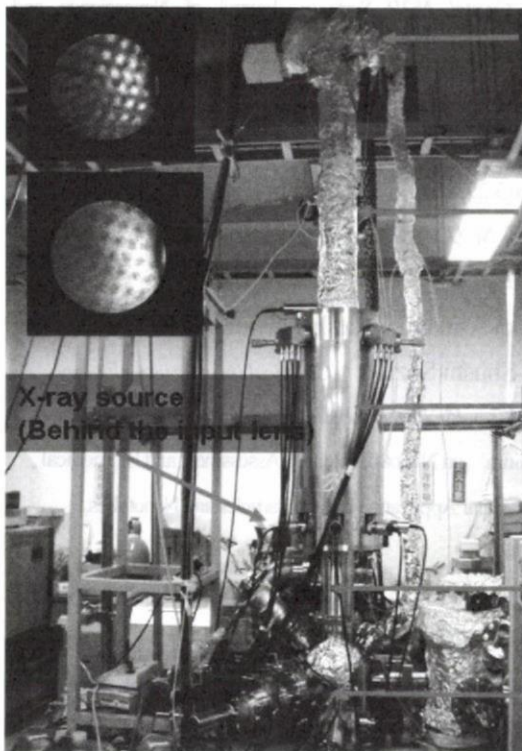


図 1 EXPEEM 装置とその概念図

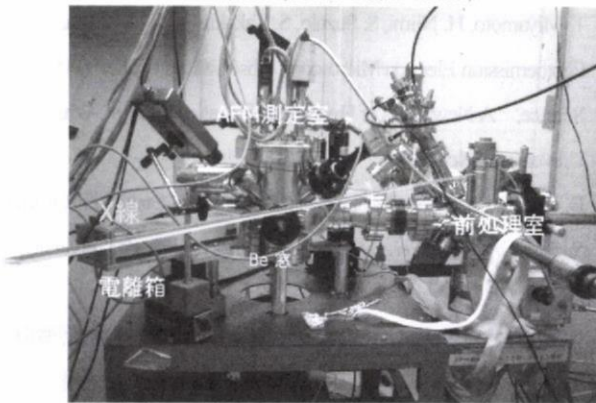


図 2 PF-BL7C に設置した XANAM 装置

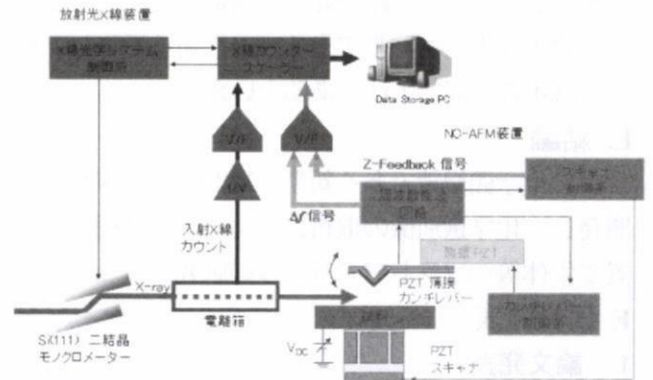


図 3 信号処理系ダイアグラム s

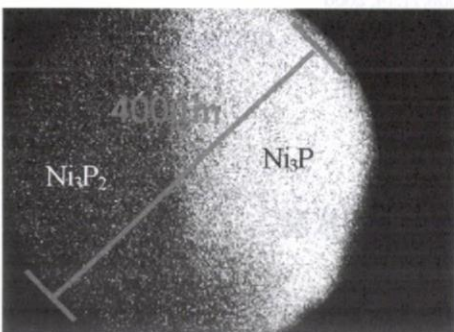


図 4 Ni_3P の PEEM 像

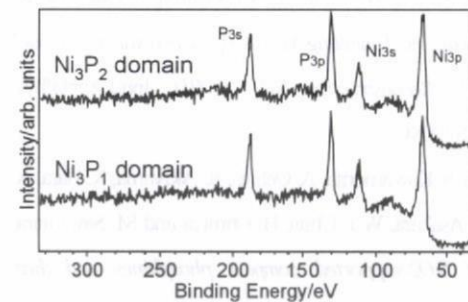


図 5 XPS スペクトル

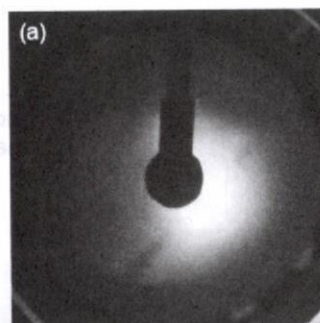
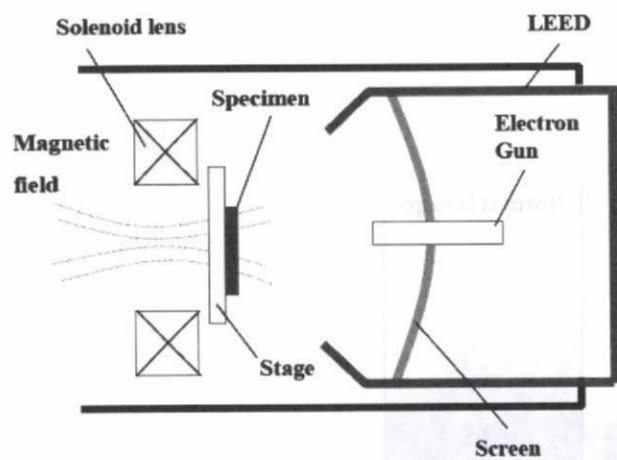


図 6 SLEEM とその像

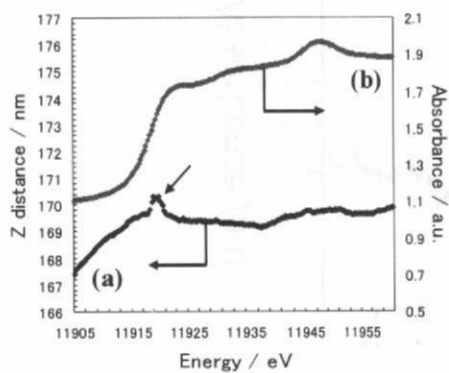


図 7 Au の XANAM スペクトル(a)および Au の L3 edge スペクトル (b)

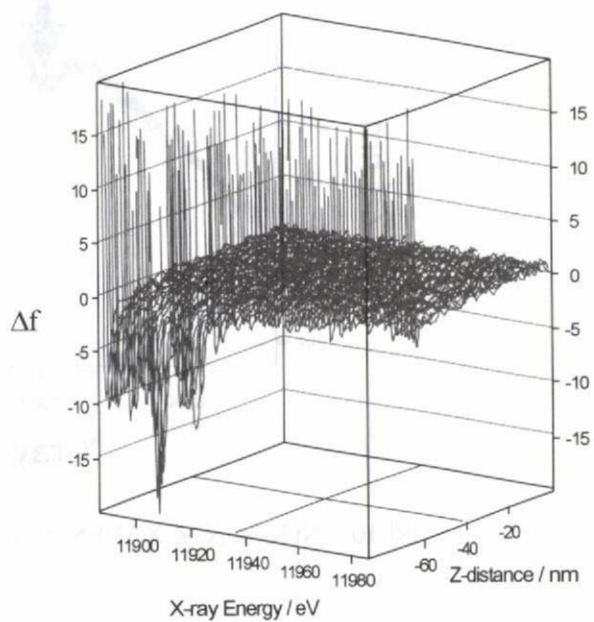


図 8 Au の XANAM-FORCE CURVE

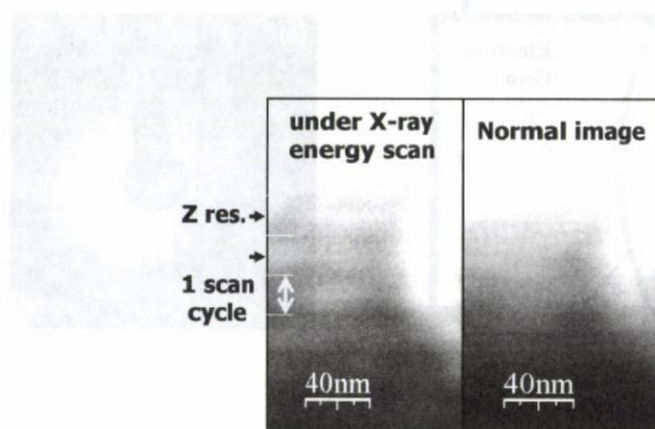


図 9 XANAM 像 (左) と通常の NC-AFM(右)

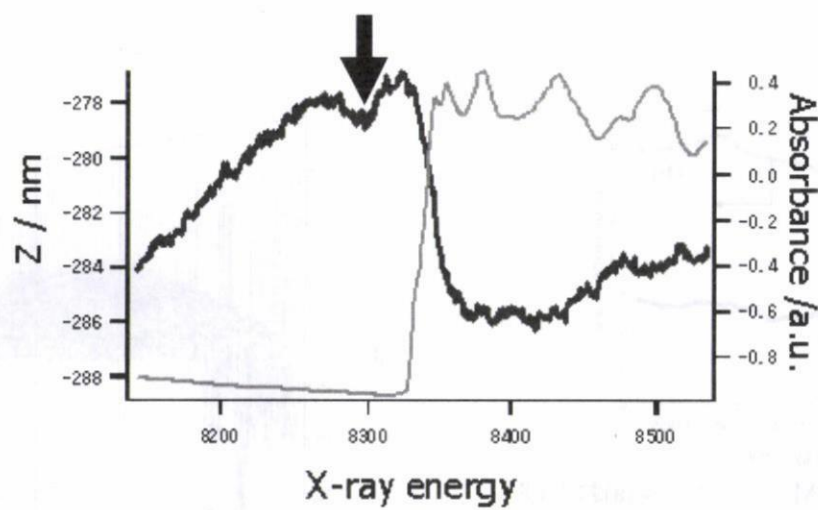


図 10 Ni K-吸収端 XANES と XANAM スペクトル

生体観察を目指した TEM エンバイロメンタルセルの開発

分担研究者 大貫惣明

北海道大学工学研究科教授

研究協力者 橋本直幸

北海道大学工学研究科准教授

研究要旨 本研究では電子顕微鏡内に適合する環境セルの開発を行い、その利用例としてガス気密性の必要な水素化反応をその場観察し、その変化を検討した。今期に製作したのは加熱型環境セルである。テストガスとして反応性が強いアンモニアガス、試料として LiH と NaH を用いた。ガス導入前後で粒子が膨張し、電子線回折像は中間生成物を確認した。ガス圧力を変化して膨張を時間変化として測定したところ、明確な圧力依存性が現れた。これは実験の結果を反応速度の観点から解析できることを示している。一方、透過能と分解能に優れる超高压電子顕微鏡に環境セルを構築するための設計を開始した。この実現により生体試料への適用が大いに期待できる。

A. 研究目的

透過電子顕微鏡によるその場観察のためのハードウェアとして環境セルの歴史は古く、500℃で 3kPa の酸素環境で超高压電顕での Ni-Cr 合金の酸化のその場観察のほか、モリブデン酸ビスマスについて 400-500℃で 100Torr の C_3H_6 ガス環境での触媒反応が報告されている [2]。また 150K 以下での 6 フッ化硫黄ガスからの結晶化のその場観察や、開放型環境セルを使った水素ガス環境下での引っ張り試験のその場観察も行われている。一方では、生体細胞の透過像観察も期待されているが、大気圧の空気中の環境セルが必須の要件となっている。

最近、次世代エネルギーメディアとしての水素が重要視されつつあり、関連材料の研究が盛んに行われているが、この反応過程のナノレベルでの解析はほとんど行われていない。この実現には電子顕微鏡内に高压のガス雰囲気を構築するための TEM 用環境セルの開発が不可欠であり、これが実現すれば、ガス反応の素過程の研究のみならず、生体細胞の観察にも適用が可能である。特に、電子顕微鏡本体の改造を必要としないクローズ型の環境セルは魅力的手段である。本研究では、高压の反応性ガスに耐ええ

る環境セルを製作し、化学反応のその場観察することを目的とした。

B. 研究方法

作成した環境セルは汎用型の 200kV 電子顕微鏡（JEOL2010）用であり、軸部はアルミニウム製、試料保持の先端部は真鍮製である。ガス導入部はステンレスパイプで、ホルダーの軸部を貫通している。図 1 にホルダーの外観を示す。この環境セルはクローズ型であり、0.2mm 厚さの Oリング 3 枚と Cu グリッド上の隔膜によって気密が保たれている。隔膜はトリアセチルセルロースをカーボン補強しており、2 気圧（0.2MPa）の空気あるいは水素に耐えることが出来た。電子線に対してはほぼ透明であり、電子線回折像でもわずかにハローリングが見られるのみである。本研究ではこの隔膜の製作がもっとも技術を要し、現時点で最良だったのはトリアセチルセルロース膜（20nm）、カーボン補強膜（50nm）である。

観察対象は室温でも化学反応が容易な NaH と LiH を用いた。ガスは反応性の大きいアンモニア（ NH_3 ）である。試料は不活性雰囲気のグローブボックス中で乳鉢で細かく粉碎し、そのサイズは 0.1 ミクロン

以下である。環境セルホルダーをアルコールで超音波洗浄し、55℃の真空中で1時間保持し、吸着ガスを除去した。粉末試料はCu グリッドに付着させ、隔膜に直接触れないようにセッティングした。これは隔膜が破れるのを防止するのに大いに役立った。ちなみにこの隔膜は電子顕微鏡内の真空雰囲気に対して0.2MPaの大気にさらしても破れることはなかった。その後、加速電圧200kVの汎用型TEMを用いて室温のガス雰囲気中で連続的に明視野像と電子線回折パターン撮影を行った。

C. 研究結果

真空中での観察：電子線回折からLiHとNaHのそれぞれの結晶構造であることを確認した。LiHは収束電子により容易に分解することから、不安定であることがわかった。アンモニアガス中の観察：LiHについて0.1MPaのアンモニア雰囲気前後の電子線回折を図2に示す。ガス導入前には点状の回折とリング回折があるが、導入後はリング回折のみとなり、その径もやや大きくなった。この変化は、 $\text{NH}_3 + \text{LiH} \rightarrow \text{LiNH}_2 + \text{H}_2$ の反応に対応すると判断した。

NaHの場合の結果を図3に示す。これもLiHとほぼ同様の挙動を示したことから、 $\text{NH}_3 + \text{NaH} \rightarrow \text{NaNH}_2 + \text{H}_2$ の反応が生じたと判断した。

図4はNaHにおけるガス導入前後の外形変化を示す。これによると面積で11~12%の増加が見られた。特に0.1MPaの場合は急激な体積膨張がLiH、NaHともに認められ、0.01MPaまで減圧すると、この体積膨張はゆっくりと進行し、30分程度でほぼ飽和した。以上の結果より、LiHとNaHの0.1MPaの NH_3 ガス反応のその場観察は可能であることが示された。今後はこの変化量の時間依存と温度依存からその反応機構を検討することにした。

なお、この環境セルでは0.2MPaの大気でも使用できることが確かめられたため、室温から200℃の範囲であれば大気環境あるいは水蒸気環境での観察は可能と思われる。

D. 考察

以上のように汎用型電子顕微鏡で積み上げつつあるECの技術をもとに、高分解能での観察を期待できる超高圧顕微鏡にECを構築するべく、その設計に取りかかっている。図5はその概略である。

超高圧電子顕微鏡の場合、電子線の透過能は大きいため、隔膜の厚さは大きな問題ではないが、高真空の確保とガスリーク時の鏡体の保護が大きな課題であり、微少リークディテクターとゲートバルブの安全回路が重要であり、この確保に多額の経費を要する。一方、温度制御機構は広いレンズギャップのため比較的容易であると推定されている。

E. 結論

本研究では電子顕微鏡内に適合する環境セルの開発を行い、その利用例としてガス気密性の必要な水素化反応をその場観察し、その変化を検討した。製作した加熱型環境セルである。テストガスとして反応性が強いと想定されるアンモニアガス、試料としてLiHとNaHを用いた。明視野ではガス導入前後で粒子が膨張し、電子線回折像は反応中間体の生成を示した。異なるガス圧力のもとで膨張を時間変化として測定したところ、明確な圧力依存性が現れた。これは本結果を反応速度として解析が可能であることを示している。一方、汎用型電子顕微鏡よりも透過能と分解能に優れる超高圧電子顕微鏡に環境セルを構築するための設計を開始した。この実現は今後とも大いに期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Ohnuki, K. Okudera, K. Hamada, T. Suda, N. Hashimoto, Observation of Hydrogen Strange Materials by Means of Environmental Cell TEM, International Symposium on Materials Design for Infrastructures, SICE2008 proceedings, (2008) pp.49-52
2. A. Ono, H. Sitoh, S. Ohnuki, N. Hashimoto, Micro-lamellar Structure in Hydrogen Storage Mg-Ni Alloys, Proceeding of 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, (2008)

2. 学会発表

1. S. Ohnuki, Environmental Cell technique in Electron Microscopy, JSPS-KOSEF Core University Program Joint Symposium on Advances in Electron Microscopy for Materials Characterization (S-07-2-3), Sapporo, 2008
2. A. Ono, H. Sitoh, S. Ohnuki, N. Hashimoto, Micro-lamellar Structure in Hydrogen Storage Mg-Ni Alloys, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, 2008
3. H. Hirasawa, K. Okudera, K. Hamada, S. Ohnuki, N. Hashimoto, T.

Ichikawa, Y. Kojima, In-situ observation of decomposing reaction in LiH and NaH by means of environmental cell 11th Joint Symposium between Hokkaido University and University of Science and Technology Beijing, Sapporo, 2008

4. 大貫惣明, 奥寺公也, 平澤寛子, 浜田弘一, 須田孝徳, 橋本直幸, 透過電子顕微鏡用環境セルの開発と含水性試料観察の試み, 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」, 平成 19 年度冬期第 4 回研究成果発表会, 苫小牧, 2008

5. 宇尾基弘, 亘理文夫, 小野寺伸, 朝倉清高, 浅岡憲三, 橋本直幸, 奥寺公也, 浜田弘一, 大貫惣明, 人工関節周囲組織中の金属の状態分析と透過電子顕微鏡観察及び Ni-Ti 合金の腐食生成物の状態分析, 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」平成 19 年度冬期 第 4 回研究成果発表会, 苫小牧, 2008

6. 宇尾基弘, 亘理文夫, 小野寺伸, 朝倉清高, 浅岡憲三, 橋本直幸, 奥寺公也, 浜田弘一, 大貫惣明, 人工関節周囲組織中の金属の状態分析と透過電子顕微鏡観察及び Ni-Ti 合金の腐食生成物の

状態分析, 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会, 京都, 2008

7. 平澤寛子, 奥寺公也, 浜田弘一, 大貫惣明, 橋本直幸, 環境セルによる LiH と NaH の分解過程のその場観察, 日本鉄鋼協会・日本金属学会両北海道支部合同夏季講演大会, 札幌, 2008

8. 大貫惣明, 平澤寛子, 濱田 弘一, 橋本直幸, 須田孝徳, 小島由緒, 環境セルによる LiH と NaH の分解過程のその場観察, 平成 20 年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会札幌, 2008

9. 川崎 洋, 須田孝徳, 橋本直幸, 大貫惣明, その場 TEM 観察による NaAlH₄ の分解ナノ構造変化, 日本鉄鋼協会・日本金属学会両北海道支部合同冬季講演大会, 室蘭 2009

10. 小野晃史, 王 永明, 橋本直幸, 大貫惣明, 斉藤英之, Mg - 6.7 mol% Ni 合金の微細組織と水素化特性, 日本金属学会 2009 年秋期 (第 144 回) 講演大会, 東京, 2009

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

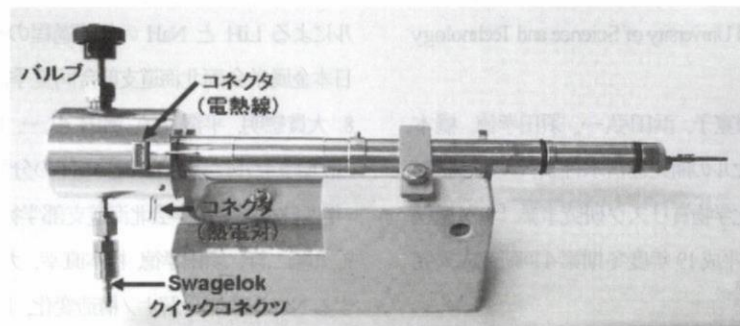


図1 作成した加熱型環境セルホルダーの概観

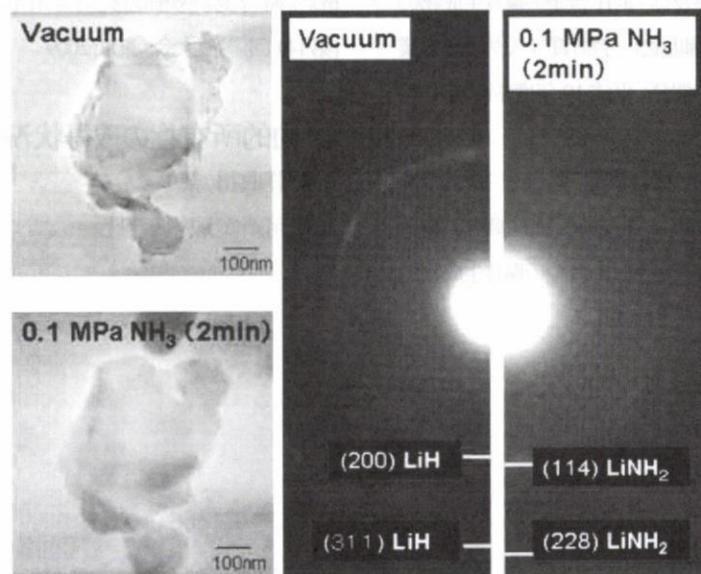


図2 アンモニアガスと反応前後のLiH粒子と電子線回折像

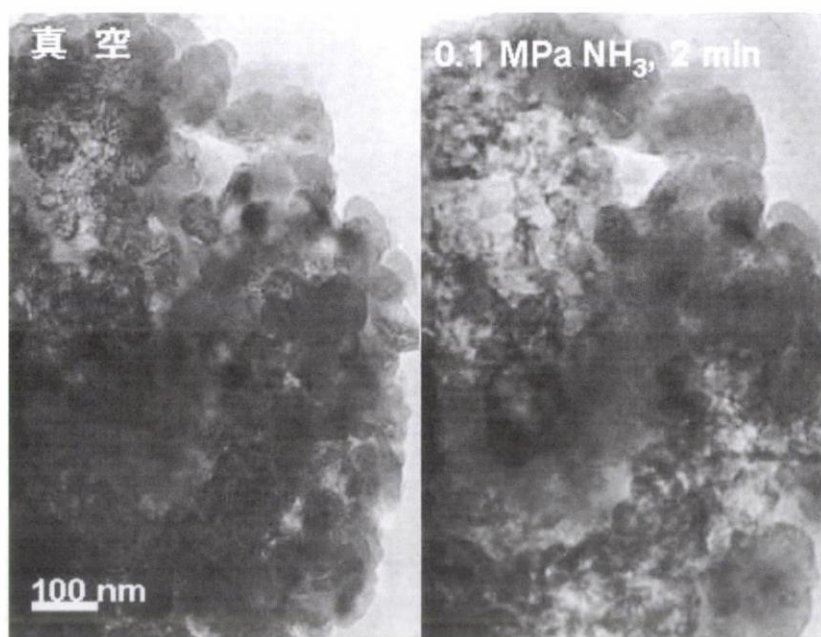


図 3 アンモニアガス反応前後の NaH 粒子の構造

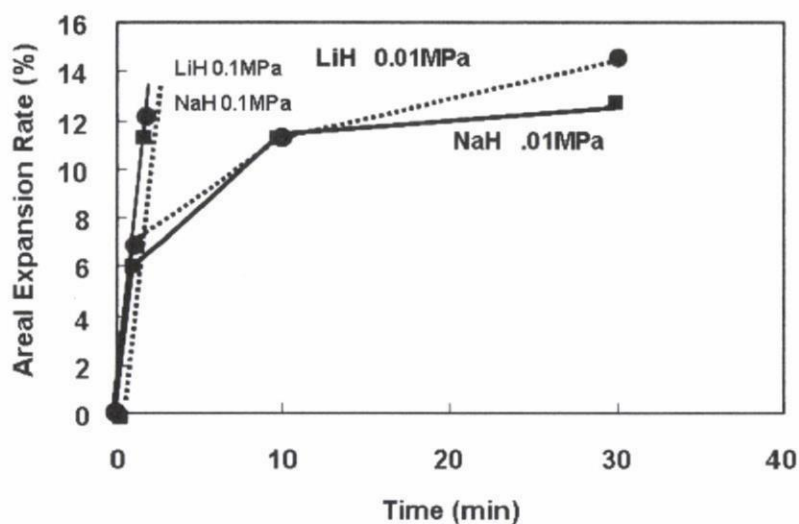


図 4 異なるガス圧力での NaH と LiH 粒子の膨張の時間依存性

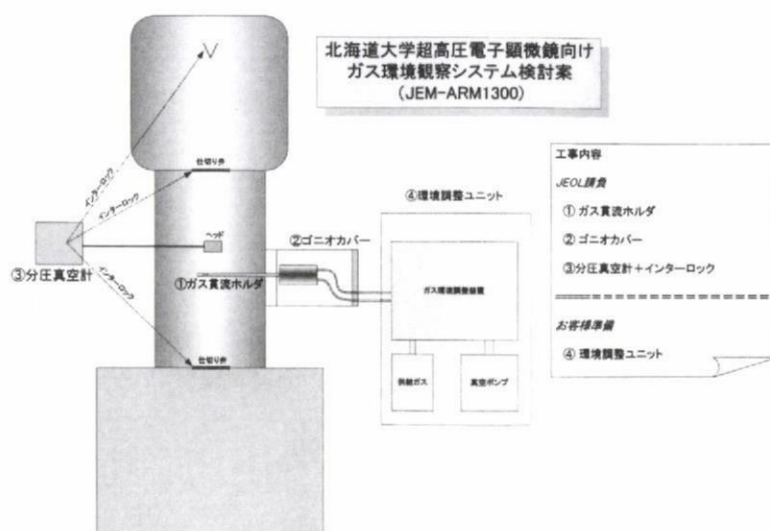


図 5 超高压電子顕微鏡用の環境セルのシステム設計の概念

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅲ. 研究成果の発刊に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
編集 F.Watari		F.Watari, K.Tohtji, K.Asaoka	Abst.Int.Symp. on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes (ISNT2008)		Japan	2008	1-78
○F.Watari, A.Yokoyama, M.Gelinsky, W.Pompe	Conversion of Functions by Nanosizing - from Osteoconductivity to Bone Substitutional Properties in Apatite	M.Watanabe, O.Okuno	Interface Oral Health Science 2007		Japan	2008	139-147
M.Gelinsky, A.Bernhardt, M.Eckert, T.Hanke, U.Konig, A.Lode, A.Reinstorf, C.Vater, A.Walther, A.Yokoyama, F.Watari	Biomaterials based on mineralised collagen an artificial extracellular bone matrix,	M.Watanabe and O.Okuno	Interface Oral Health Science 2007		Japan	2007	323-328
K.Yada	Recent Trends of Projection X- Ray Microscopy In Japan	Jun Kawai	Proc.19thInt. Conf. X-Ray Micro- analysis	Elsevier	Amster dam, Holland	2009 in press	
編集 米澤徹		米澤徹	ナノ粒子の創製と 応用展開	フロンテ ィア出版	東京	2008	
米澤徹	ナノ粒子の創製と応用展 開	米澤徹	ナノ粒子の創製と 応用展開	フロンテ ィア出版	東京	2008	1-8
米澤徹	ハイブリッド微粒子	日本化学会コロ イドおよび 界面化学部会	現代界面コロイド 化学の基礎	丸善	東京	印刷中	
米澤徹	微粒子の生体影響	日本化学会コロ イドおよび 界面化学部会	現代界面コロイド 化学の基礎	丸善	東京	印刷中	
米澤徹	金ナノ粒子の調製	春田正毅	金ナノテクノロジー ー:その基礎と応用	シーエム シー出版	東京	印刷中	
田路和幸	カーボンナノチューブの 切断と長さ制御	情報技術協会	最新フィラー技術 全集	情報技術 協会	東京	2008	95-107
浅岡憲三	チタン多孔体とリン酸カル シウムの修飾		多孔体の精密制御と 機能・物性評価	サイエンス &テクノロ ジー	東京	2008	448-454
Asaoka K, Okuno O, J Tesk	High temperature investment	WJ. O'Brien,	Dental Materials and Their selection, 4th Ed	Quintessen ce Publishing	Chicago	2008	262-271
浅岡憲三	歯冠修復材料 審美美歯用材料		コア歯科理工学	医歯薬出 版	東京	2008	81-88 および 136-138

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版
○F.Watari, N.Takashi, A.Yokoyama, M.Uo, T.Akasaka, Y.Sato,S.Abe, Y.Totsuka, K.Tothji	Material nanosizing effect on living organism: non-specific, biointeractive, physical size effect	J.Roy.Soc.Interface	doi:10.1098/rsif.2008. 0488.fo cus		2009
○巨理文夫	ナノマテリアルの生体反応 -リ スクと活用-	ファルマシア	45 (3)	239-244	2009
○Watari F., Abe S., Rosca I. D., Yokoyama, A. Uo M., Akasaka T., Takashi N., Totsuka Y., Hirata E., Matsuoka M., Ishikawa K., Itoh S. and Yawaka Y.	Visualization of invasion into the body and internal diffusion of nanoparticles,	<i>Bioceramics 21(Key Engineering Materials,</i> 396-398,)	21	569-572	2009
○F.Watari, T.Akasaka, Xiaoming Li, M.Uo, A.Yokoyama	Proliferation of osteoblast cells on nanotubes	Front. Mater. Sci	DOI 10.1007/s11706-009-0 034-z		2009
Watari F., Abe S., Koyama C., Yokoyama A., Akasaka T., Uo M., Matsuoka M., Totsuka Y., Esaki M., Morita M., and Yonezawa T.	Behavior of in vitro, in vivo and internal motion of micro/nano particles of titanium, titanium oxides and others,	<i>J. Ceram. Soc. Jpn.,</i>	116(1)	1-5	2008
Watari F., Abe S., Tamura K., Uo M., Yokoyama A., and Totsuka Y.	Internal diffusion of micro/nanoparticles inside body,	<i>Bioceramics 20(Key Engineering Materials,</i> 361-363)	20	95-98,	2008
○F.Watari, S.Inoue, N.Takashi, Y.Totsuka, A.Yokoyama	Reaction of cells and tissue to material nanosizing	Trans.Mat.Res.Soc.Jap	33	209-214	2008
○巨理文夫	ナノ粒子の生体反応性と為害性 発現	金属	78 (9)	859-864	2008
F.Watari, T.Akasaka, M.Terada, M.Uo, K.Ishikawa, M.Matsuoka, Y.Kuboki, E.Hirata, A.Yokoyama, S.Itoh, Y.Yawaka, Y.Totsuka, Y.Kitagawa, S.Abe, M.Suzuki	Cell Culture on Nanotube Scaffolds for Implant Application	Proc. 4th Max-Bergmann Symposium 2008	C:39-40		2008
F.Watari, T.Akasaka, M.Matsuoka, K.Ishikawa, K.Nakanishi, M.Uo, S.Itoh, Y.Totsuka, M.Masaya, Y.Bando	Cell culture on nanotube scaffolds	10th Int.symp.on Biomaterialization Abstract,		F-13	2008
Wang, W., Yokoyama, A., Liao, S., Omori, M., Zhu, Y., Uo, M., Akasaka, T., Watari, F.	Preparation and Characteristics of a binderless carbon nanotube monolith and its biocompatibility.	Mat.Sci.Eng. C.	28	1082- 1086	2008
宇尾基弘	X線による元素分析	J.Dental Engineering	167	34-25	2008
S.Abe, I.Kida, M.Esaki, T.Akasaka, M.Uo, Y.Sato, B.Jeyadevan, Y.Kuboki,M.Morita, K.Tothji, F.Watari	Biodistribution imaging of magnetic nanoparticles in mice compared with X-ray scanning analytical microscopy and magnetic resonance imaging	Bio-Med.Mater.Eng		in press	2009
Abe S., Fukuzumi T., and Tachikawa T.	Ab-initio calculations on the structures and electronic states of dimethylsulfide-water clusters,	<i>Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Metal Chem.,</i>	38(1)	105-110	2008
○Abe S., Koyama C., Akasaka T., Uo M., Kuboki Y. and Watari F.	Internal distribution of several inorganic microparticles in mice,	<i>Bioceramics 21(Key Engineering Materials,</i> 396-398)	21	539-542	2009

Abe S., Koyama C., Uo M., Akasaka T., Kuboki Y. and Watari F.	Time dependence of TiO ₂ and Pt particle's biodistribution in mice and its visualization using X-ray scanning analytical microscope	<i>J. Nanosci. Nanotech.</i>		in press	2009
Abe S., Kida I., Esaki M., Akasaka T., Uo M., Sato Y., Jeyadevan B., Kuboki Y., Morita M., Tohji K., and Watari F.	Biodistribution imaging of magnetic nanoparticles in mice compared with X-ray scanning analytical microscopy and Magnetic Resonance imaging	<i>Bio-Med. Mater. Eng.</i>		in press	2009
Abe S., Koyama C., Esaki M., Akasaka T., Uo M., Kuboki Y., Morita M., and Watari F.	<i>In vivo</i> internal diffusion of several inorganic microparticles through an oral administration	<i>Bio-Med. Mater. Eng.</i>		in press	2009
Abe S., Watari F., Takada T., and Tachikawa H.	A DFT and MD study on the interaction of carbon nano-materials with metal ions,	<i>Liquid. Crys. Mol. Crys.</i>		in press	2009
Nakagawa H., Ohira M., Hayashi S., Abe S., Saito S., Nagahori N., Monde K., Shinohara Y., Fujitani N., Kondo H., Akiyama S.-I., Nakagawara A., and Nishimura S.-I.	Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system	<i>Cancer Lett.</i>	270,	296-301,	2008
○N. Sakaguchi, F. Watari, A. Yokoyama, Y. Nodasaka	High-resolution electron microscopy of multi-wall carbon nanotube in the subcutaneous tissue of rats	Journal of Electron Microscopy	58	159	2008
N. Sakaguchi, F. Watari, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, H. Ichinose	Low-voltage and high-voltage TEM observations on CNT of rat <i>in vivo</i>	Bio-Medical Materials and Engineering		in press	2009
Y. Takenaka, A. Yanagi, H. Masuda, Y. Mitsui, H. Mizuno and N. Haga	Random insertion of injected DNA molecules into the macronuclear chromosome of <i>Paramecium caudatum</i>	Jpn. J. Protozool.	41	159-168	2008
T. Abe and N. Haga	Cytotoxicity mechanism of Ag particles in <i>Paramecium</i>	Jpn. J. Protozool.	42	36-37	2009
H. Sasaki and N. Haga	Method for cryopreservation of <i>Paramecium caudatum</i>	Jpn. J. Protozool.	42	16-17	2009
N. Haga and T. Abe	Studies on immaturin, a sexual rejuvenescence molecule in <i>Paramecium</i> , by polyclonal antibody	Jpn. J. Protozool.	42	62-63	2009
K. Yada, T. Abe and N. Haga	Studies of <i>Paramecium caudatum</i> by means of scanning electron microscope and projection X-ray microscope	Bio-Medical Materials and Engineering	In press	1-6	2009
南 勝利・斉藤泰・矢田慶治	投影型X線顕微鏡の最前線	検査技術	13 (12)	63-66	2008
○Akasaka T, Watari F	Capture of bacteria by flexible carbon nanotubes	Acta Biomaterialia	5	607-612	2009
Akasaka T, Yokoyama A, Matsuoka M, Hashimoto T, Abe S, Uo M, Watari F	Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2) to carbon nanotube sheets	Bio-Medical Materials and Engineering		in press	2009

Akasaka T, Nakata K, Uo M, Watari F	Modification of the dentin surface by using carbon nanotubes	Bio-Medical Materials and Engineering		in press	2009
○T.Akasaka, F.Watari	Carbohydrate coating of carbon nanotubes for biological recognition	Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostrucr	16	114-125	2008
X.M. Li, C.A. Van Blitterswijk, Q.L. Feng, F.Z. Cui, F. Watari	The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro	Biomaterials	29	3306-3316	2008
○X.M. Li, H. Gao, M. Uo, Y. Sato, T. Akasaka, Q.L. Feng, F.Z. Cui, X.H. Liu, F. Watari	Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro	Journal of Biomedical Materials Research Part A	DOI: 10.10		2008
X.M. Li, X.H. Liu, W. Dong, Q.L. Feng, F.Z. Cui, M. Uo, T. Akasaka, F. Watari	In vitro evaluation of porous poly(L-lactic acid) scaffold reinforced by chitin fibers	Journal of Biomedical Materials Research Part B	DOI: 10.1002/jb		2009
X.M. Li, X.H. Liu, G.P. Zhang, W. Dong, Z.Y. Sha, Q.L. Feng, F.Z. Cui, F. Watari	Repairing 25mm bone defect using fibres reinforced scaffolds as well as autograft bone	Bone	43	S94	2008
X.M. Li, X.H. Liu, M. Uo, Q.L. Feng, F.Z. Cui, F. Watari	Investigation on the mechanism of the osteoinduction for calcium phosphate	Bone	43	S111	2008
X.M. Li, X. Liu, Y.X. Yu, X.H. Qu, Q.L. Feng, F.Z. Cui, F. Watari	Recent patents on polymeric scaffolds for tissue engineering	Recent Patents on Biomedical Engineering	2	65-72	2009
○Li X., Gao H., Uo M., Sato Y., Akasaka T., Abe S., Feng Q., Cui F., and Watari F.	Maturation of osteoblast-like SaoS2 induced by carbon nanotubes	<i>Biomed. Mater.</i> ,	4,	15005-15012	2009
Ikuse Nakamura, Yoshinori Yamanoi, <u>Tetsu Yonezawa</u> , Takane Imaoka, Kimihisa Yamamoto, and Hiroshi Nishihara	Nanocage Catalyst ? Rhodium Nanoclusters Encapsulated with Dendrimers as Accessible and Stable Catalysts for Olefin and Nitroarene Hydrogenations	<i>Chem Commun.</i>	2008(44)	5716-5718	2008
<u>Tetsu Yonezawa</u> , Kazuki Uchida, Yoshinori Yamanoi, Shintaro Horinouchi, Nao Terasaki, and Hiroshi Nishihara	Room-Temperature Immobilization of Gold Nanoparticles on Si(111) Surface and Their Electron Behaviour	<i>Phys Chem Chem Phys</i>	10(46)	6925-6927	2008
Hideya Kawasaki, Tsuyoshi Sugitani, Takehiro Watanabe, <u>Tetsu Yonezawa</u> , Hiroshi Moriwaki, and Ryuichi Arakawa	Layer-by-layer Self-assembled Multilayer Films of Gold Nanoparticles for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry	<i>Anal. Chem.</i>	80(19)	7524-7533	2008
Misaki Nakai, Yoshinori Yamanoi, Yoshihiko Nishimori, <u>Tetsu Yonezawa</u> , and Hiroshi Nishihara	Observation of Electrochemical Single Electron Transfer Events of Au Nanoparticles in Aqueous Solution in the Presence of Both Amine and Sulfonate Surface-active Agents	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i>	47(35)	6699-6702	2008
Takehiro Watanabe, Hideya Kawasaki, <u>Tetsu Yonezawa</u> , and Ryuichi Arakawa	Surface-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) of Low Molecular Weight Organic Compounds and Synthetic Polymers Using Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles	<i>J. Mass Spectrosc.</i>	43	1063-1071	2008