

図24 ITO 粒子をマウス尾静脈注入後の体重・脾臓重量(上)、各臓器におけるIn濃度(中)およびIn含有量(下)の経時変化。体重減少と脾臓の肥大が認められる。

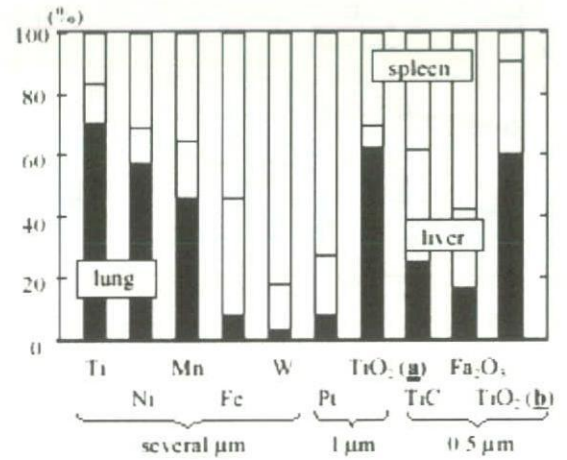


図25 各種微粒子のマウス尾静脈注入1日後の肺、肝臓、脾臓の各臓器における相対的存在比率

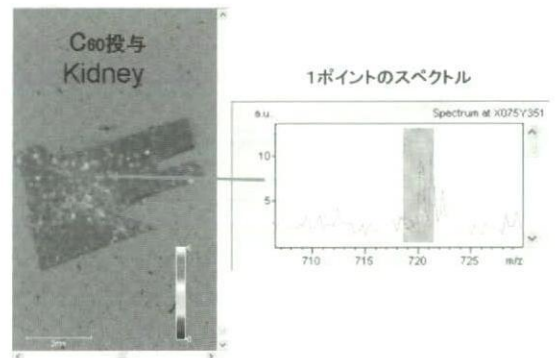


図26 水溶化フラーレン投与1時間後のラット腎臓の C60 レーザーマス・マッピング(左)と腎臓内、1点からのマスペクトル(右)。C60 (M=720)付近にピークが認められる。

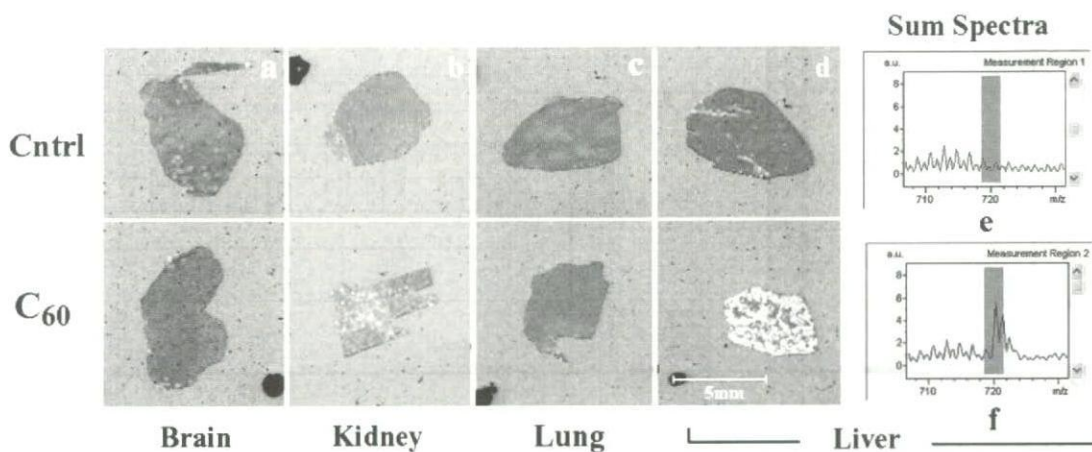
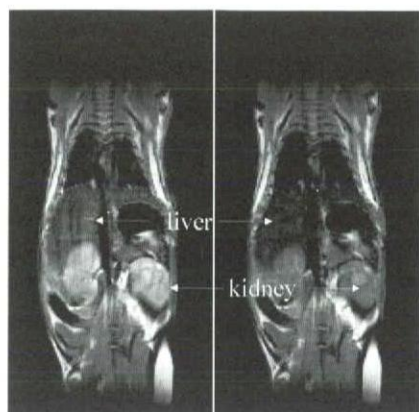


図27 水溶化フラーレン投与1時間後のラット各臓器中の C60 のレーザーマス・マッピング。a)脳、b)腎臓、c)肺、d)肝臓、e)肝臓全体のマスペクトル(投与前←d 上に対応)、f)同(投与後←d 下に対応):C60 (M=720)付近にピークが認められる。



before after 60 min

図28 マグネタイトナノ微粒子(11nm Fe_3O_4)を尾静脈注入したマウスのMRI像。投与前(左)、投与1時間後(b)の比較から肝臓、脾臓への濃縮が確認できる。

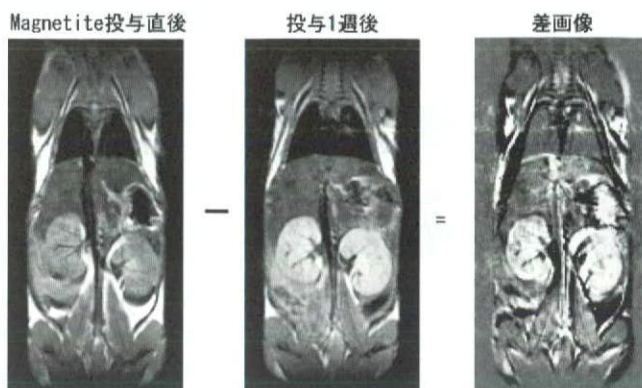


図29 マグネタイト粒子を尾静脈注入したマウスの投与前、投与1週後のMRI差画像。腎臓への濃縮が確認できる。

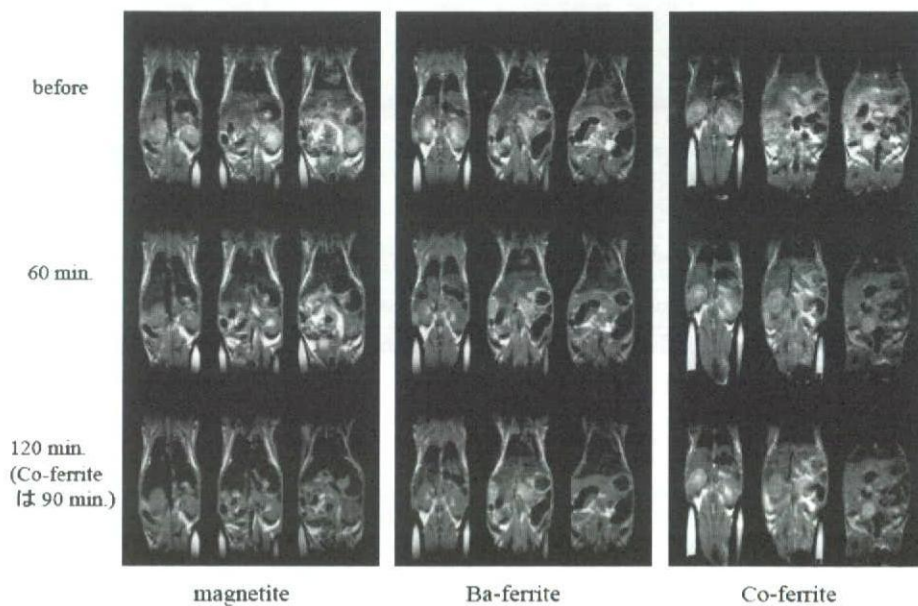


図30 各種磁性粒子(マグネタイト、Ba フェライト、Co フェライト)の体内循環:尾静脈注入後のマウスMRI像

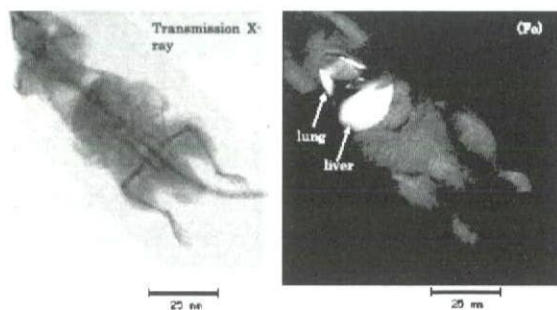


図31 マグネタイトナノ微粒子尾静脈注入1日後のXSAM元素マッピング:肺から肝臓への移行が進行している

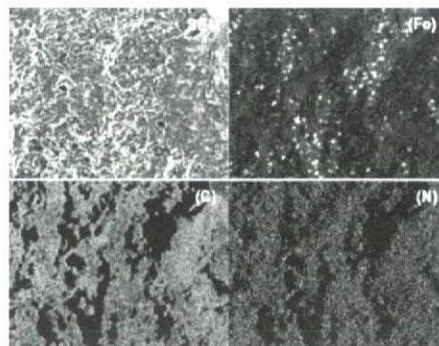
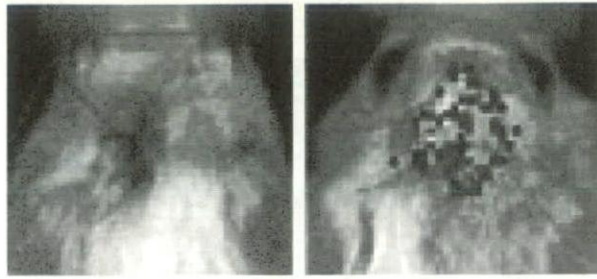


図32 マグネタイトナノ粒子を尾静脈注入後の肝臓のSEM像とEDS元素分析(Fe, C, N)。Fe微粒子の臓器内分布が確認される



sham

5mg

図33 NF- κ B/luciferase トランスジェニックマウスの頭頂骨上にポリエチレン摩耗粉負荷 7 日後のバイオイメージング。5mg 負荷で化学発光量最大を示す。(後出 II.3. 遠山/小野寺ら)

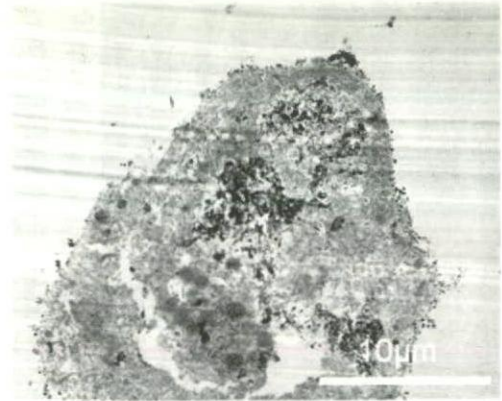
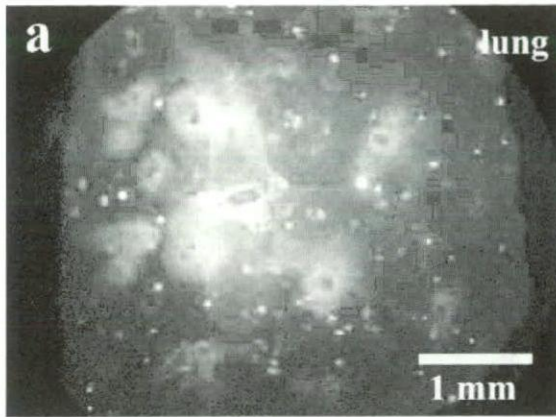


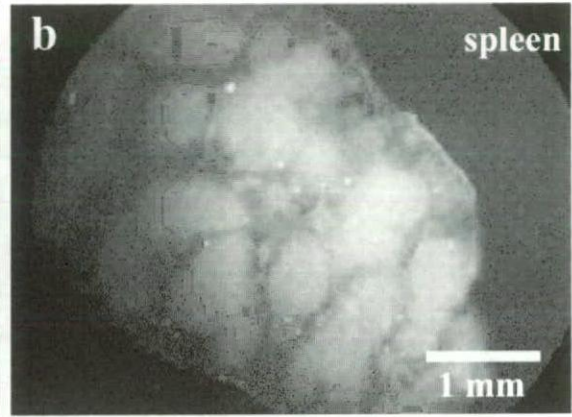
図34 CNT 添加正常肝細胞の TEM 像



a

lung

1 mm



b

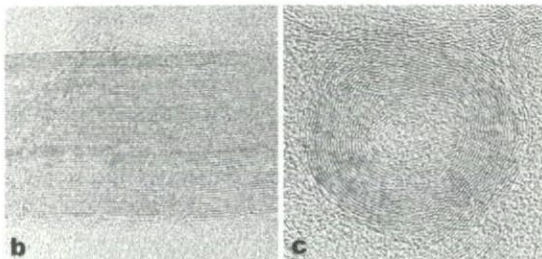
spleen

1 mm

図35 蛍光(クマリン)ラベリングしたポリ乳酸微粒子をマウス尾静脈へ注入1週間後の各臓器の蛍光顕微鏡像。



a



b

c

図36 多層 CNT の構造模式図(a)、長さ方向平行断面(b)および垂直断面(c)の超高压電顕による高分解能原子像

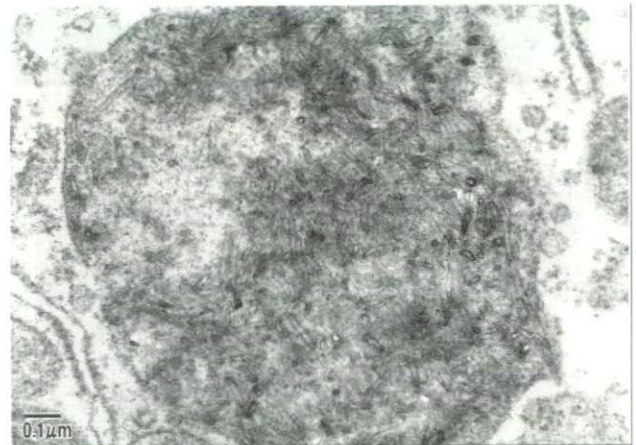


図37 ラット軟組織埋入1週後、細胞のライソゾーム中に取込まれた 220nm-CNT

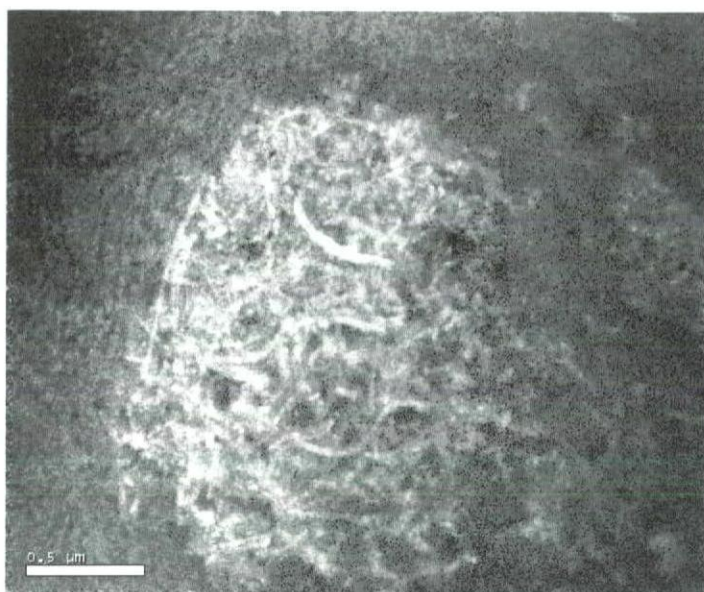


図38 ラット皮下に包埋された MWCNT のカーボンマップ像

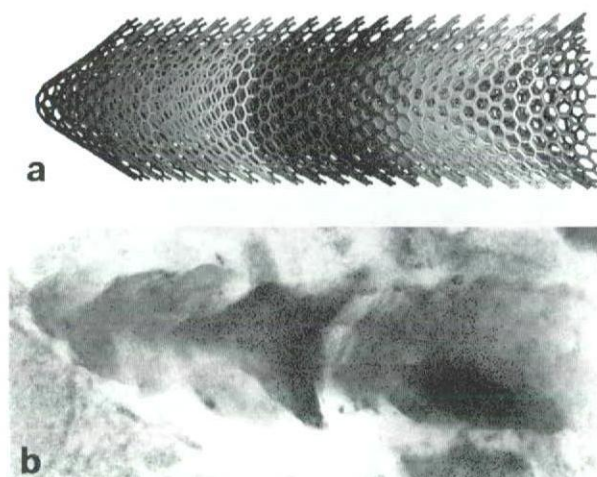


図39 CNF の結晶構造(a)と ラット軟組織に1年埋入後、細胞内ライソゾーム中に取り込まれ、破折断片化が進行中の 1200nm-CNf (b) (100kV 電顕観察)



図40 細胞内ライソゾーム中に取り込まれた 1200nm-CNf の超高压電顕による高分解能原子像(埋入1年後)。破折断片化の進行により結晶構造が乱れている。



図41 細胞内ライソゾーム中に取り込まれた 1200nm-CNf の超高压電顕による高分解能原子像(埋入1年後)。破折断片化の進行により、結晶構造が乱れた約 15 原子層の厚みの結晶破片。

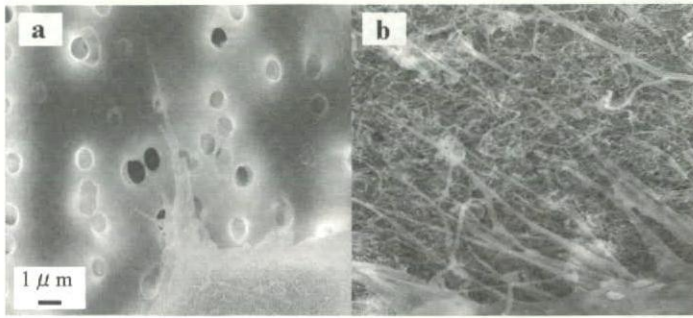


図42 ポリカーボネート膜(a)、CNT(b)上で培養した細胞末端のSEM像。CNT上で多数の細胞突起を張り出し強く付着する。

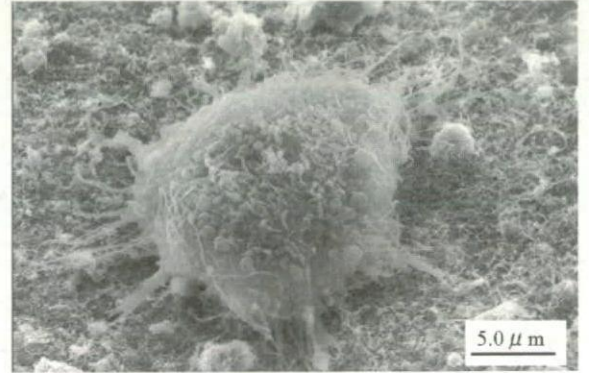


図43 トリプシン処理後のCNTスカフォールド上の培養細胞のSEM像。細胞末端から張り出した多数の突起がCNTと機械的に結合し、細胞を剥離できない。

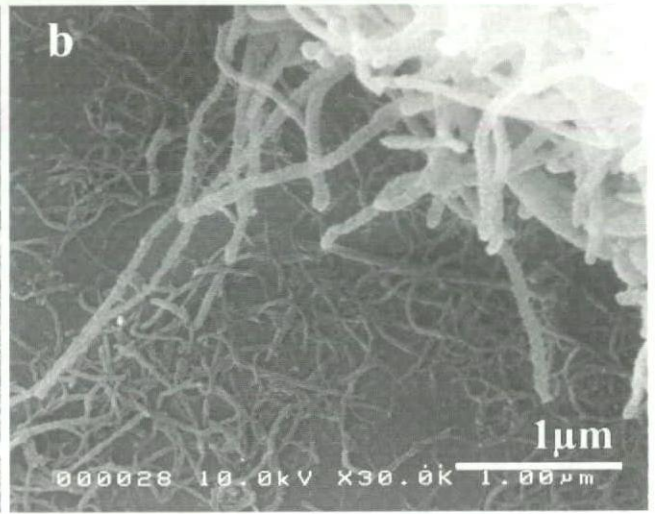
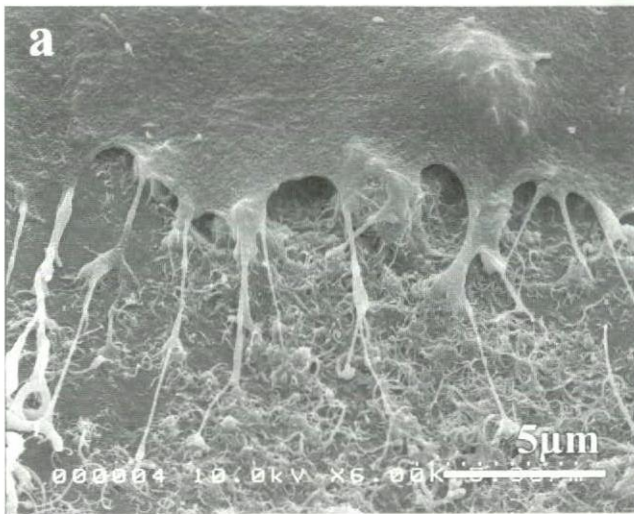


図44 CNTスカフォールドと強く接着する細胞末端糸状仮足。(a)骨芽細胞様細胞 Saos2、(b)神経細胞 PC12

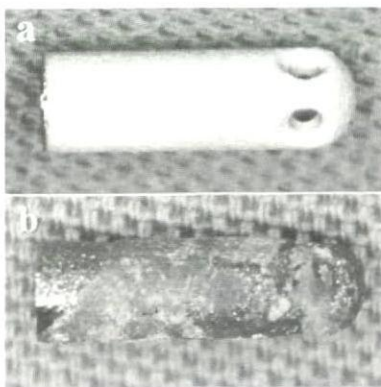


図45 アパタイトコーティングチタン・デンタルインプラントの臨床適用失敗例



図46 アパタイトの2種の存在形態。a:合成アパタイト、b:天然骨(エナメル質)

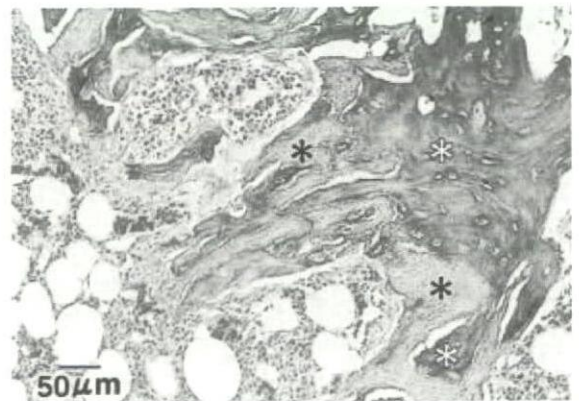


図47 ナノアパタイト-コラーゲンコンポジットの骨置換性。ナノコンポジット部(黒*)の吸収と新生骨形成(白*)が不可分に生じ、結果として骨置換性が達成されている。

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

生体に投与した有機・無機粒子の体内動態のイメージングに関する研究

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	阿部薫明	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	久保木芳徳	北海道大学・名誉教授
分担研究者	森田 学	岡山大学医歯薬学総合研究科教授
研究協力者	八若保孝	北海道大学歯学研究科准教授
研究協力者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科准教授
研究協力者	赤坂 司	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	江崎光恵	北海道大学歯学研究科大学院生
研究協力者	岩寺信喜	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 一般に生体親和性を持つと言われている材料でも、微小なサイズになるとその生体への影響が変化することが考えられる。数マイクロメートルからナノサイズの微粒子が生体内に取り込まれた際、体内をどのように循環し、特定臓器へと到達・滞留・排出される様子を可視化法の確立を目的とした。

本研究では、本プロジェクトの課題として挙げていたマイクロ・ナノ粒子体内動態の4レベルの可視化法について検討し、1) 広領域(100mm程度)全身動態の可視化のための走査型蛍光エックス線分析顕微鏡(XSAM)観察、磁気共鳴撮影法 2) 中領域(100 μ m~10mm程度)の臓器内分布の可視化法として蛍光顕微鏡、3) 微小領域(10 μ m~1mm程度)の可視化法として走査型電顕 SEM-EDS法、4) 超微小領域(1~10 nm程度)の可視化のため透過型電顕法、の使用により各レベルでの有機・無機マイクロ・ナノ粒子の体内での循環の様子を可視化することに成功した。また、誘導結合プラズマ発光分析(ICP)法による投与粒子の定量化・経時的挙動の定量的な追跡にも成功した。投与されたマイクロ・ナノサイズの粒子の体内分布は、その物質ごとに大きく異なるが、主に脾臓・肝臓から検出された。この体内動態にはサイズの効果も観察された。また、金属粒子の場合には投与直後からほぼ一定の割合で各臓器へと分布し、一方酸化物の場合は、一時的に肺に滞留する傾向がみられた。更に XSAM-ICP 測定結果の相関を検討することにより、XSAMによる観察結果の定量的評価を試みた。

A. 研究目的

マイクロ・ナノサイズの粒子が生体内に取り込まれた場合、一般に生体親和性を持つと言われている材

料でも細胞に対して刺激性を持つことがある。我々
はこれまでに、生体親和性に優れているといわれて
いる生体材料でも、数ミクロンから数百ナノメート

ルのサイズになると細胞への刺激性を持つものがあること見出した。一方で、歯科診療の際、口腔内で歯牙や歯科材料を切削・研削するが、その一部は嚥下され、またエアロゾルとなり診療室内の患者・治療従事者へと暴露される可能性がある。また、人工関節やインプラントなどの長期使用により磨耗粉(微粒子)が生じ、体内に取り込まれる可能性は否定できない。また、医薬・化粧品や日用品といったの分野でもマイクロ・ナノ微粒子が広範囲に使用されてきている。それ故、我々は日常生活の中で知らないうちにマイクロ・ナノ微粒子に曝されている可能性がある。

そこで本研究では、生体内に取り込まれた有機・無機粒子の体内での循環・滞留・排出の挙動を確認することを目的とし、体内分布の追跡・その可視化を試みた。

B. 研究方法

披験動物

オス 8-12 週齢の ICR 系マウスを用いた。

披験物質

歯科材料・工具

観察用の切削片作成のため、抜去歯牙および歯科鑄造用合金 (GP-エース 300、以下、金パラと略記) を歯科用エアタービンと切削工具 (通常切削用ダイヤモンドポイント (DP)、カーバイドバー (WC)) を用いて切削、回収した。得られた試料は島津 SALD-700 粒度分布測定装置、および日立 S-4000 走査型電子顕微鏡 (SEM) をもちいて観察した。以下、被研削材と切削工具の組み合わせを、歯/DP の要領で略記する。

無機・有機粒子

投与無機粒子として、Ti (1-3 μm , 10 μm)、Fe (1-2 μm , 2-3 μm)、Ni (0.8, 3-7 μm)、Pt (1 μm)、TiO₂ (0.05 μm , 1 μm , 2 μm)、TiC (0.6-0.9 μm)、Fe₂O₃ (0.5 μm)、Fe₃O₄ (0.01 μm)、W (1 μm)、Mn (1 μm)、ITO (Indium-Tin Oxide: 0.01 μm) CoFe₂O₄ (0.03 μm)、BaFe₁₂O₁₉ (0.2 μm)、Sm₂Fe₁₇N₂ を用いた (括弧内は製造元データによる平均粒径)。ナノマグネタイト (Fe₃O₄) は東北大院環境・田路研、ITO は東大院理・米澤先生、CoFe₂O₄、

BaFe₁₂O₁₉、Sm₂Fe₁₇N₂ は石巻専修大理工・羽田先生より提供していただいた。

また有機物マイクロ・ナノ粒子として、粒径数百 nm に造粒した球状化カーボンナノチューブ (以下、sph-CNT)、フラレノール (C₆₀(OH)_m, n_{ave} = 25 : 以下 C₆₀(OH)₂₅) を入手、蛍光色素をドープしたポリ乳酸 (以下、m-PLA)、化学的に親水化処理した多層カーボンナノチューブ誘導体 (以下、CNT-COOH) を合成した。sph-CNT は清水建設より、m-PLA は Concordia 大・I. Rosca 博士より提供していただいた。

投与と観測

無機粒子の分散液、寒天中に分散させた試料、若しくは乾燥粉末をマウス (ICR 系オス) に投与し、一定期間観察した。投与方法としては、尾静脈からの血中投与、経口投与、及び肺への直接噴霧を行い、一定期間経過を観察した。その後、エーテルを用い、適宜安楽死させて肺・肝臓・脾臓などの臓器の一部を摘出した。各種金属微粒子の臓器への到達・滞留の様子は摘出した臓器から 1 mm 厚の切片を作成し、堀場 XGT-2000 エックス線分析顕微鏡 (XSAM)、日立 P-4010 誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES、以下 ICP)、および EDAX Genesis エネルギー分散型蛍光エックス線分析装置 (SEM-EDS) により評価した。ICP 分析の際には、各摘出臓器を 800°C で灰化させ、王水に溶解させた。

また無機粒子の体内動態可視化のため、Varian INOVA 7 tesla 動物用磁気共鳴撮影装置 (MRI) による撮像を試みた。麻酔下のマウス尾静脈から試料薬液 (5 mg/mL x 0.3 mL) を投与した。Spin-echo 法により、tr/te = 5000/20 ms, FOV 80 x 40, スライス厚 1 mm の条件で撮像した。また、MRI 撮像後に開腹したマウスの全身に対して XSAM による観察も行った。

有機粒子に関しては、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡および日立 H-800 透過型電子顕微鏡により観察した。

(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に関する指針に基づき行った。

C. 研究結果

C-1. 歯科切削片

切削片のサイズ・形状は、切削工具と被研削材との組み合わせにより大きく異なった。SEMでの観察結果を図1-1に示す。金パラ/DPでは平均粒径100 μm 程度の鉋屑状の切削片が多く見られた。金パラ/WCでは、平均粒径は100 μm 程度であるが不定形の切削片が観察された。一方、歯牙を切削した歯/DPの場合には、数~数十ミクロン(平均:10 μm 程度)の不定形の切削片に、更に細かな粒子が付着している様子が観察された。粒度分布測定からも同様の所見が得られた(図1-2、3)。

C-2. 魚類への暴露とその体内動態の観察

マイクロ・ナノ粒子の生体への影響を調べるため、魚類を無機粒子暴露下で飼育・観察した。様々な濃度のTiO₂けん濁液中でメダカを飼育し、その影響を調べた。濃度50 mg/Lでは飼育6日目以降、濃度30 mg/Lでは飼育10日目以降で死亡する個体が観察された。一方、15および5 mg/Lの場合、2週間以上死亡する個体は観察されなかった(図2-1)。

次に、無機粒子けん濁液中で金魚(コアカ)を飼育し、暴露環境下での体内への取り込み、その循環状態の観察を試みた。その結果を図2-2に示す。10 mg/LのNi分散液中で一週間飼育されたコアカでは、消化管へのNiの滞留を観測された。この現象はたの無機粒子(Ti、Fe、TiO₂など)投与時においても観察された。また、消化管を摘出した腹部からもこれら投与物質の蛍光X線が検出されている。図2-3は一週間TiO₂を暴露されたコアカ体内のSEM-EDS観察像である。SEM像(b)や炭素Cの蛍光X線マッピング像(c)に見られるコアカの組織とは独立してTiO₂が体内に局在している様子がTiの蛍光X線マッピング像(d)に示された。

C-3. マウスへの投与とその体内動態の観察

・経口投与

無機粒子をけん濁させた寒天ブロック(図3-1)を給餌し、10 or 50 mg/dayの条件でTiO₂若しくはPt粒子を10日間経口投与した。その後、各臓器を摘出しXSAMを用いて滞留状態を確認した。TiO₂を50 mg/dayの条件で投与した個体においては、投与

物質の肺・肝臓・脾臓への到達が観測された(図3-2~4)。この結果から経口投与によっても無機物質が体内を循環し各臓器へと到達する事が示された。一方、10 mg/dayの給餌条件、およびPt分散寒天を給餌したマウスの臓器からは、投与物質は検出されなかった。

・尾静脈投与

—XSAMによる可視化・追跡—

無機粒子を尾静脈から血中投与し、その後の体内動態の追跡を試みた。図4-1は、TiO₂投与後3時間の肺および肝臓の蛍光X線マッピング像と元素分析スペクトルである。肺からTi元素の強いシグナルが観察されている。

次に、全身への分布の様子の可視化を試みた。図4-2はFe₃O₄投与後1日のマウスである。投与粒子の、肺・肝臓への到達が確認された。図4-3はTiO₂を投与直後、1日後、1週間後のマウスの全身のマッピング像である。時間初期には肺のみから検出されるTiO₂が、徐々に肝臓へと移行し、一週間後には大部分が肝臓に滞留している様子を示している。体内動態の様子を更に詳しく可視化するため、無機粒子を投与したマウスを樹脂包埋して数mm厚に切片化(図4-4)する事により、体内の連続的な観察を試みた。その結果を図4-5に示す。この結果からも肺・肝臓から投与粒子(TiO₂)が観測されたが、他の臓器への滞留は観察されなかった。

そこで各臓器を摘出した後、蛍光X線マッピング像・元素分析スペクトルを測定し、投与物質のスペクトルの積分強度の比較から、臓器間の比較・相対強度の評価を行った(図4-6)。蛍光X線測定から得られる強度は、被研物質が低濃度の場合、検出強度は物質濃度に比例する事が知られている。図4-7は、投与後1日の様々な物質の分析結果である。被研物質やその粒径の違いにより、体内での分布の様子が大きく異なる事が示された。これらの実験において肺・肝臓・脾臓からは投与物質が検出されたが、腎臓からは殆ど検出されなかった。図4-8は、Fe₃O₄を投与後の体内動態の経時的変化の観察結果である。時間初期には肺から強い信号が検出されたが、時間と共に減少し、一方で脾臓からの信号が強くなった。また相対的には微弱であるが、腎臓からもFe₃O₄の信号が検出された。図4-9は、投与物

質の粒径・化学種の違いによる体内動態への効果を示したものである。1 μm 程度の Pt 粒子の場合、時間初期から脾臓において強い信号が検出され、臓器間の相対比もほぼ一定である。しかし TiO_2 の場合、時間初期に肺から非常に強い信号が検出されるが、その後徐々に減少し、肝臓や脾臓での濃度が上昇している。粒径が 0.5 μm 程度の Fe_2O_3 では、投与直後は肺から強い信号が観察されたが、3 時間後には脾臓・肝臓からの信号が大きくなり、それ以降は、3 者の比はほぼ一定であった。同じ粒径の TiO_2 の場合、投与後 1 日までは肺から強い信号が検出されたが、その後急速に減退し、肝臓・脾臓からの信号が強くなった。このように、同じ粒径であっても、体内動態は大きく異なり、また同じ物質であっても、動態が異なる事が示された。

臓器内での分布の様子をより詳細を調べるために、臓器の切片に対し SEM-EDS 観察を行った。 TiO_2 投与後 1 日の肺の結果を図 4-10 に示す。生来の組織の主たる構成元素である炭素や窒素、リン、硫黄の蛍光 X 線マッピング像は SEM 像とほぼ一致した。しかし投与粒子由来の Ti 元素の蛍光マッピングは、それらとは異なり独自の形状の分布を示し、組織内で局在する様子が観測された。図 4-11 には、 Fe_3O_4 投与後 1 日の肝臓の SEM-EDS 観察結果を示す。こちらでも、Fe 元素のマッピング像は、SEM 像とは異なり、臓器内に点在する様子が観察された。

—ICP による追跡・定量化—

血中投与を行った各種無機粒子の各臓器内への滞留の様子を ICP により経時的に追跡した。対象とした臓器は、脳・心臓・肺・肝臓・腎臓・脾臓および血液である。Pt の場合、投与直後から脾臓・肝臓・肺において高濃度で検出された(図 5-1、4)。特に脾臓の場合、2000-4000 $\mu\text{g/g}$ と顕著に高く、肝臓・肺などよりも 1-2 桁高い値を示した。また、その濃度は投与直後から 4 週に渡り、ほぼ一定であった。一方、肝臓・肺においては投与後から経時的に、臓器内濃度が低下したが、その挙動には違いが見られた。肝臓の場合、800 $\mu\text{g/g}$ 程度から徐々に減少し、4 週間後には 400 $\mu\text{g/g}$ 程度となったが、肺の場合時間初期には 250 $\mu\text{g/g}$ 程度検出されたが、1 週間で 50 $\mu\text{g/g}$ 程度まで低下し、その後はほぼ一定の値を示した。その他の臓器内濃度は更に 1-2 桁低く、

時間初期の心臓、腎臓で各々 6、1 $\mu\text{g/g}$ 程度検出されたが、それ以降は 1 $\mu\text{g/g}$ 程度、腎臓では 1 $\mu\text{g/g}$ 以下であった。

臓器内から検出された Pt の重量についても、同様の傾向が見られた(図 5-2、5)。肝臓からは 1000-2000 μg 程度、脾臓からは、数百 μg 、腎臓・肺からは各々、数および数-数十 μg 程度、心臓からの検出量は 1 μg 前後であった。

ITO の場合、 $n=1$ の結果ではあるが、やはり投与直後から脾臓・肝臓・肺において高濃度で検出された(図 5-3)。しかしその挙動は、Pt とは異なっていた。時間初期では、肺から高濃度(5000 $\mu\text{g/g}$)で検出されその後、急速に濃度が低下し 2 週・4 週間後には 1000 $\mu\text{g/g}$ 程度になった。また脾臓でも 3000 $\mu\text{g/g}$ 程度から徐々に濃度が低下し、4 週間後には 1000 $\mu\text{g/g}$ 程度になった。肝臓については、経時的な変化は見られず数百 $\mu\text{g/g}$ 程度の値を示した。臓器内から検出された ITO の重量については、実験数の少なから大きなバラツキがみられたが、Pt とは異なり、上述の臓器(肺・肝臓・脾臓)それぞれから数百 μg 程度 検出された。また、腎臓において数十 μg 程度 検出されている事も、Pt と異なる点であった。

また Pt、 TiO_2 、ITO 投与時のマウスの糞・尿の分析から、投与粒子の排泄状況の検討を行った。尿については投与後 3 日間(Pt は 3 日および 7 日間)各日に採取された試料を ICP により分析した。採取された糞・尿の量は、各個体ごと、採取日ごとによるバラつきがあった(図 5-6、7)。Pt 投与後の各日の分析結果を図 5-8、9 に示す。投与後 1 日目においては、数 μg の Pt が検出された。一方、2 日目以降では、誤差範囲レベルの量しか検出されなかった。糞に関しては、Pt の発光波長が P および Fe 元素の発光波長と隣接しているため、ICP では検出が出来なかった。そこで、XSAM を用いて採取した糞の蛍光 X 線測定から、含有元素の分析を行った。分析結果を図 5-10 に示す。ICP 測定による Pt 検出の際に障害となった P および Fe 元素の強い信号は確認されたが、Pt からの信号 (9.43, 11.07 keV) は観察出来なかった。これらの結果から、投与された Pt 粒子の一部は投与後 1 日程度で尿として排泄されている事が示された。しかしその量は、投与総量の 0.1% 以下であった。 TiO_2 、ITO に関しては、糞・尿中から検出はされなかった。投与 Pt 粒子のマウス体内で

の分布状態を模式的に図5-11に示した。

・単回強制暴露（経肺投与）

Pt粒子を肺へ直接噴霧したマウスの各臓器への分布をICPにより観察した(図6-1)。投与直後と1週間後とで体内分布が大きく異なり、また乾燥粉末が肺から他の臓器へと循環した事が示された。

・XSAMのデータの定量的評価に向けて

無機粒子の体内動態の追跡・可視化法として簡便且つ、優れているXSAMの測定結果の定量的評価法について検討した。対象試料としては、Ptマイクロ粒子を投与したマウスの肺・肝臓・脾臓を用いた。これまでのICPによる観察結果から投与Pt粒子は主に、肺・肝臓・脾臓に到達・滞留しており、またXSAMでは上記3臓器以外からは検出されなかったため、これらの臓器についての測定結果から、XSAMとICPとの測定結果(図7-1)の相関を検討した。XSAM測定時のPt元素からの蛍光X線信号の積分強度(XSAM_Intensity)およびその相対比(XSAM_ratio)を横軸に、ICP測定値から得られたPt重量(Pt_weight)、濃度(Pt_concentration)、その相対比(Pt_ratio)を縦軸としたプロットを行った。得られた結果を図7-2に示す。またその相関係数の算出も行った。その結果、XSAM_ratio対Pt_ratioの組み合わせにおいて最も高い相関(相関係数:0.8899)が得られた。

C-4. 磁性粒子の動態

—MRIによる追跡・可視化—

ナノマグネタイト(Fe_3O_4)粒子の造影能を評価するために、様々な濃度で Fe_3O_4 を寒天中に分散させた試料の緩和時間—相対強度曲線を測定した(図8-1、2)。 Fe_3O_4 濃度の上昇と共に急激な強度の減少がみられ、高濃度では体内での造影効果が期待される。

次に Fe_3O_4 粒子を投与したマウス体内での動態の観察を行ったXSAMの結果からは、マグネタイトが肺・肝臓・脾臓・腎臓に到達している事が示された(図4-8)。MRI測定では、投与直後から肝臓・腎臓・脾臓において輝度の低下が確認された(図8-3)。これは、上述の臓器へのマグネタイトの到達

によるものと考えられ、XSAMの結果とも一致する(肺については測定原理上、MR信号はほぼ観測されない)。この輝度の低下は投与後、経時的に進行した(図8-4、5)。投与後1週間のマウスでは、各臓器での輝度には回復傾向が見られた。 CoFe_2O_4 、 $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ の投与を行った場合も、同様に肝臓・腎臓・脾臓において輝度の低下が確認された(図8-6)。

C-5. 有機物粒子の体内動態の可視化

・ポリ乳酸粒子の動態

m-PLAのキャラクタリゼーションの結果、およびSEM像を図9-1に示す。今回得られたm-PLAは、蛍光色素を約2 wt%含有する粒子系1 μm 程度の粒子であった。このm-PLAを尾静脈より投与し、1日後および1週間後のマウスの肺・肝臓・腎臓・脾臓の蛍光顕微鏡写真を図9-2~7に示す。どちらの条件でも相対的に肺・脾臓へとm-PLAが密に存在している様が観測された。

・ナノカーボン物質の動態

作製した親水化カーボンナノチューブCNT-COOHの合成スキームを図10-1に示す。CNT表面にカルボン酸を化学修飾することにより、数百ppmレベルでも容易に水中に分散するCNT誘導体が得られた(図10-2)。

CNT-COOHを尾静脈より投与した直後、経過観察一週、および四週間後のマウスの肺・肝臓・脾臓の顕微鏡写真・TEM像を図10-4に示す。TEM像に見られるチューブ状の物質、顕微鏡により観察された黒い点は各々CNT-COOH、その凝集体と考えられる。観察の結果、投与後の時間初期から4週間まで、肺・肝臓においてはCNT-COOHが臓器内に滞留している事が確認された。またその滞留量は、経時的に減少している印象を受けた。1週後の脾臓においてもCNT-COOHの存在が確認されたが、その滞留量は、上述の2臓器と比較して低かった。一方、今までの観察結果からはCNT-COOHの腎臓への到達・滞留は確認出来ていない。sph-CNTについても同様に、肺・肝臓への到達・滞留が見られた。フラレノール($\text{C}_{60}\text{OH}_{25}$)は球状分子の凝集体として存在している(図10-10)。カーボンナノチューブのような特徴的な形状を持たないため、現在のところ

TEM 観察による同定には成功していない。

D. 考察

歯科診療時には今回観察したような切削片が多量に発生し、その一部は口腔ないバキュームによって除去できず、唾液や水とともに嚥下によって体内に取り込まれる可能性がある。また、生じた切削片の一部はエアロゾルとなって診察室内に浮遊し、同じ室内にいる全ての人に吸収されている可能性もある。過去の研究において、 $10\mu\text{m}$ 以下の物質がその化学種に依存せず細胞刺激性を示す事が示唆されており、室内環境という観点からも呼吸器系に及ぼす影響について考慮する必要性を認める。

魚類への暴露実験結果より、生存率という観点からは通常の飼育条件下と変わらない濃度域 (10 mg / l) でも、暴露無機粒子が体内に取り込まれ、消化管などから吸収され、滞留している事が示唆された。

マウスへの経口投与、単回強制暴露の結果からも固体の無機粒子が体内で吸収され、循環し他の臓器へと移行することが示された。経口投与・単回強制暴露ともにまだ実験は不十分ではあるが、両投与方法ともにいくつかの臓器へと到達している事、またその分布が血中投与した場合と同様な挙動を示す事が見出された。特に、肺への噴霧の場合、投与直後と1週間後とで体内分布が大きく変化した。乾燥粉末状態で投与されたのちに、体内を循環するという事は非常に興味深く、粉塵・排ガス・エアロゾルなど環境由来の暴露とその後の影響についても検討する必要があるといえよう。一方、経口投与の場合には、その吸収率は非常に低く、Pt の場合には10日間の総量で体重の1%以上の物質を投与しても、検出限界以下であった。今後は、このような微量の暴露物質(特に歯科診療切削片など)の生体への影響、その閾値についての検討が必要であると考えられる。

マウス尾静脈への血中投与による結果からは、体内での分布状態が、投与物質の種類・性質に依存して大きく異なる事、また同じ化学種でもサイズ・粒径により、循環挙動が異なる事が示された。また、金属粒子では投与直後からその化学種由来の一定の比率で各臓器に分布し、酸化物の場合、一時的に肺に滞留し、その後各臓器へと分散していく傾向がみ

られた。投与後の経過観察期間が長くなると、各臓器からの検出量が低下する傾向がみられる事から、投与物質の臓器内濃度は一定期間の後、経時的に減少するものと考えられる。しかし、糞・尿の分析から、これらの投与物質が殆ど検出されなかった。この事から、これら投与無機物質が体外には殆ど排泄されず、1) これまで検査していない部位へと移行して蓄積している、若しくは、2) 広く体内に低濃度で滞留している、可能性が考えられる。現在、分析対象をこれまでの、脳・肺・心臓・肝臓・腎臓・脾臓・血液から、膀胱・筋肉・骨・尾などへと拡張して、投与粒子の体内動態の解明を試みている。

SEM-EDS の結果から、肺中の TiO_2 はある種のパターンに沿って偏在している事、肝臓中の Fe_3O_4 は、点在している事が観測された。生物組織を構成する炭素 (C)、窒素 (N) やリン (P)、硫黄 (S) の分布像は、SEM により観測された像と類似していたが、上述の投与物質の分布は、これらとは大きく異なり、検出元素が体内由来ではなく、投与物質由来である事、またそれらの物質が、生態組織内で局在している事が示された。これらの観察をより詳細に行う事により、生態組織内での無機粒子の分布・動態の解明が期待される。また、これら無機粒子の生体への刺激性を検討する為には、これら循環・滞留のタイムスケールの詳細を解明し、その滞留時間内で炎症等が惹起されるのか(時間的閾値)、若しくは排泄されずに残留する粒子が微量でも生体への刺激性を示すのか(量的閾値)について調べていく必要があると考えられる。

今回の研究期間内には着手出来なかったが、図4-5に示した連続切片のXSAM像や、MRIの測定結果には3次元情報が含まれている。今後、これらの情報の再構築を行うことにより、より高次な体内動態の可視化が期待される。

XSAMとICPとの測定結果の相関を検討することにより、Pt元素の場合にはXSAMの測定結果が臓器内濃度の相対比と良い一致を示す事が見出された。このことは、XSAMによりPt元素の体内分布状態の可視化を行うと同時に、臓器間の相対濃度の決定も出来る事を示しており、体内動態の可視化においてのXSAMの有用性を示すものである。今後は、他の元素についても両測定法の相関関係の有無を検討する事により、XSAMによる体内動態の追跡・可視

化法が確立されるものと考えられる。

m-PLA の実験結果から、有機物粒子でも各臓器への到達・滞留の様子が異なることが示された。今回の実験では定量的な評価までには至らなかったが、相対的には肺と脾臓とへの濃縮の傾向がみられた。m-PLA の母体である PLA(ポリ乳酸)は生分解性ポリマーという特性から、医療分野において広く応用されており、何らかの要因で発生した PLA マイクロ・ナノ粒子が体内を循環し、各臓器へと到達する事も考えられる。今後、上述の臓器をはじめとする各臓器と PLA 粒子との親和性・為害性についても検討する必要があると考えられる。一方で、この肺・脾臓への濃縮は、ドラッグデリバリー、コントロールドリリリースといった医療応用を目指す際の基礎的な知見として活用される事も期待される。

TEM 観察によりマウスに投与した CNT-COOH が、投与直後から 4 週に渡り、肺・肝臓に滞留している様子が確認された。観察の際、各臓器に滞留している CNT の量は経時的に減少している印象を受けたが、その評価には蛍光ラベル化などマクロな視野での観察が可能な別な手法との組み合わせが必要であると考えられる。今回ナノカーボン物質の一つとして用いたフラレノールは、C60 表面の多数の水酸基(-OH)を導入する事により親水性を付与したものであるが、-OH 導入により分子の表面状態・化学的性質が変化するだけでなく、-OH の導入量に比例して C60 母体の炭素結合が sp^2 軌道から sp^3 軌道へと変化する。このため元来 C60 が持ち合わせていた諸性質(電気的特性やラジカル捕捉・一重項酸素発生能など)の変化も予想される。「C60 同等のサイズの粒子」としてのモデル系としては利用価値があるが、生体との相互作用(毒性など)の検討には、慎重な検討が必要であると考えられる。

E. 結論

課題として挙げていたマイクロ・ナノ粒子体内動態の 4 レベルの可視化法について検討し、XSAM、MRI、蛍光顕微鏡、SEM-EDS、TEM などの使用により、広領域(100mm 程度)・中領域(100 μ m~10mm 程度)・微小領域(10 μ m~1mm 程度)超微小領域(1~10 nm 程度)各レベルでのマイクロ・ナノ粒子の体内動態の可視化に成功した。また、ICP による投

与粒子の定量化・経時的挙動の定量的な追跡にも成功した。更に XSAM-ICP 測定結果の相関の検討により、XSAM による観察結果の定量的評価を試みた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tachikawa H., Abe S.: Spectral shifts of ozone molecule by the complex formation with a water molecule, *Chem. Phys. Lett.*, **432**, 409-413 (2006)
2. Tachikawa H., Abe S.: Reaction dynamics following electron capture of chlorofluorocarbon adsorbed on water cluster: A direct density functional theory molecular dynamics study, *J. Chem. Phys.*, **126**, 194310-194319 (2007)
3. Abe S., Fukuzumi T., and Tachikawa T.: Ab-initio calculations on the structures and electronic states of dimethylsulfide-water clusters, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Metal Chem.*, **38**(1), 105-110 (2008)
4. 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, *Cancer Lett.*, **270**, p296-301, (2008)
5. 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, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**(1), 1-5 (2008)
6. Watari F., Abe S., Tamura K., Uo M., Yokoyama A., and Totsuka Y.: Internal diffusion of micro/nanoparticles inside body, *Key Engineering Materials*, 361-363, p95-98, (2008)
7. Uo M., Asakura K., Tamura K., Totsuka Y., Abe S., Akasaka T., and Watari F., XAFS analysis of Ti and Ni dissolution from pure Ti, Ni-Ti alloy, and SUS304 in soft tissues, *Chem. Lett.*, **37**, 958-959, (2008)
8. Abe S., Koyama C., Uo M., Akasaka T., Kuboki Y. and Watari F.: Time dependence of TiO₂ and Pt particle's biodistribution in mice and its visualization using X-ray scanning analytical microscope, *J. Nanosci. Nanotech.*, (in press)
9. Abe S., Koyama C., Akasaka T., Uo M., Kuboki Y. and Watari F.: Internal distribution of several inorganic microparticles in mice, *Key Engineering Materials*, 396-398, p539-542 (2009)
10. 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 particles in mice compared with Magnetic Resonance imaging

and X-ray scanning analytical microscopy, *Bio-Med. Mater. Eng.*, (in press)

11. Abe S., Koyama C., Esaki M., Akasaka T., Uo M., Kuboki Y., Morita M., and Watari F., Visualization of biodistribution of several inorganic particles in mice, *Bio-Med. Mater. Eng.*, (in press)

12. Abe S., Watari F., Takada T., and Tachikawa H.: A DFT and MD study on the interaction of carbon nano-materials with metal ions, *Liquid Cryst. Mol. Cryst.*, (in press)

13. Terada M., Abe S., Akasaka T., Uo M., Kitagawa Y., and Watari F.: Development of a multiwalled carbon nanotube coated collagen dish, *Dental Mater. J.*, 28, p82-88 (2009)

14. 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, *Key Engineering Materials*, 396-398, p569-572 (2009)

15. Terada M., Abe S., Akasaka T., Uo M., Kitagawa Y., and Watari F.: Multiwalled carbon nanotube coating on titanium, *Bio-Med. Mater. Eng.*, (in press)

16. 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, *Biomed. Mater.*, 4, p15005-15012 (2009)

17. Kuboki Y., Terada M., Kitagawa Y., Abe S., Uo M., Watari F.: Interaction of collagen triple-helix with carbon nanotubes: Geometric property of rod-like molecules, *Bio-Med. Mater. Eng.*, (in press)

18. 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-Med. Mater. Eng.*, (in press)

2. 学会発表

1) ○阿部薫明, 森山英樹, 新倉謙一, Fei Feng, 門出健次, 西村紳一郎: 任意の糖鎖を導入可能な糖鎖捕捉フラウレンの設計: 第2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(札幌, 2006年6月22日~23日), 同講演予稿集, p. 16, 2006

2) ○阿部薫明, 森山英樹, 新倉謙一, Fei Feng, 門出健次, 西村紳一郎, 亘理文夫: バイオ応用を目指した糖鎖結合フラウレンの作製: 平成18年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏期セミナー(盛岡, 2006年7月22日), 同講演予稿集, p. 11, 2006

3) ○阿部薫明, 赤坂司, 宇尾基弘, 亘理文夫: バイオ応用へ向けた機能性フラウレンの作製: 平成18年度秋期第48回日本歯科理工学会学術講演会(名古屋, 2006年10月28日~29日), 同講演予稿集, p. 360, 2006

4) ○阿部薫明, 森山英樹, 新倉謙一, Fei Feng, 門出健次, 西村紳一郎, 亘理文夫: 任意の糖鎖を導入可能なフラウレン誘導体の設計 —バイオ応用を目指して—: 第28回日本バイオマテリアル学会(東京, 2006年11月27日~28日), 同講演予稿集, p. 282, 2006

5) ○阿部薫明, 小山千佳, 赤坂司, 宇尾基弘, 久保木芳徳, 亘理文夫: 生体に投与した金属ナノ微粒子の体内動態の観察: 第3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(仙台, 2006年12月11日~12日), 同講演予稿集, p. 21, 2006

6) ○阿部薫明, 小山千佳, 赤坂司, 宇尾基弘, 久保木芳徳, 亘理文夫: 金属微粒子の体内動態の可視化と生体組織への影響: 第19回代用臓器・再生医学研究会(札幌, 2007年2月2日), 同講演予稿集, p. 8, 2007

7) ○阿部薫明, 小山千佳, 赤坂司, 宇尾基弘, 久保木芳徳, 亘理文夫: 蛍光エックス線顕微鏡を用いたナノマテリアルの体内動態の可視化: 2007年三学協会北海道支部研究発表会(札幌, 2007年2月6日~7日), 同講演予稿集, p. 4, 2007

8) ○阿部薫明, 亘理文夫, 田地川浩人: 妨流圏でのオゾン-水錯体の太陽光分解メカニズム: 北海道支部2007年冬季研究発表会(札幌, 2007/2/7), 同講演予稿集, p. 124, 2007

9) ○阿部薫明, 赤坂司, 宇尾基弘, 久保木芳徳, 亘理文夫: 各種金属微粒子の体内動態のイメージング: 平成19年度春期第49回日本歯科理工学会学術講演会(札幌, 2007年5月12日~13日), 同講演予稿集, p. 241, 2007

10) ○阿部薫明, 小山千佳, Iosif Daniel Rosca, 赤坂司, 宇尾基弘, 古月文志, 久保木芳徳, 亘理文夫: マウスに投与したマイクロ・ナノ微粒子の体内動態の可視化法の開発: 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(東京, 2007年8月1日), 同講演予稿集, p. 34, 2007

11) 小山千佳: X線分析顕微鏡を用いた金属微粒子のマウスの体内動態の観察: 第49回歯科基礎医学会学術大会(札幌, 2007年8月30日), 同講演予稿集, p. 198, 2007

12) Mitsue Esaki, ○Shigeaki Abe, Ikuhiro Kida, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, Fumio Watari: Determination of administered magnetite nanoparticles in mice: Magnetic resonance imaging and X-ray scanning electronic microscope. : International Dental Materials Congress 2007 (Bangkok, 2007年11月21日~24日), 同講演予稿集, p. 356, 2007

13) ○Shigeaki Abe, Chika Koyama, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, Fumio Watari: Visualization of distribution of inorganic micro/nano particles in mice using X-ray scanning electronic

- microscope : International Dental Materials Congress 2007 (Bangkok, 2007年11月21日~24日)、同講演予稿集、p. 357、2007
- 14) ○阿部薫明、小山千佳、Iosif Danel Rosca、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、亘理文夫：有機・無機微粒子の体内動態イメージング法の検討：第29回日本バイオマテリアル学会(吹田、2007年11月26日~27日)、同講演予稿集、p. 409、2007
- 15) ○阿部薫明、小山千佳、江崎光恵、赤坂司、宇尾基弘、森田学、久保木芳徳、亘理文夫：各種マイクロ・ナノ粒子の生体内での分布状態の追跡とその可視化：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(名古屋、2007年12月18日)、同講演予稿集、p. 28、2007
- 16) ○阿部薫明、亘理文夫、田地川浩人：カーボンナノ材料と金属イオン(Mn^{2+})との相互作用に関する理論的研究：北海道支部2008年冬季研究発表会(札幌、2008年1月30日)、同講演予稿集、p. 93、2008
- 17) ○阿部薫明、小山千佳、江崎光恵、Iosif Danel Rosca、赤坂司、宇尾基弘、森田学、久保木芳徳、亘理文夫：マウス体内での有機・無機粒子の体内循環挙動の追跡：第20回代用臓器・再生医学研究会(札幌、2008年2月2日)、同講演予稿集、p. 1、2008
- 18) ○阿部薫明、江崎光恵、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、亘理文夫：各種マイクロ・ナノ粒子の生体内での分布状態の追跡とその可視化：平成20年度春期第51回日本歯科理工学会学術講演会(横浜、2008年4月26日~27日)、同講演予稿集、p. 231、2008
- 19) ○阿部薫明、小山千佳、江崎光恵、Iosif Rosca、赤坂司、宇尾基弘、森田学、久保木芳徳、亘理文夫：有機・無機マイクロ粒子の生体内での分布状態の可視化：平成20年度春期第51回日本顕微鏡学会学術講演会(京都、2008年5月21日~23日)、同講演予稿集、p. 194、2008
- 20) ○Shigeaki Abe, Chika Koyama, Mitsue Esaki, Ikuhiro Kida, Iosif Rosca, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Manabu Morita, Yoshinori Sato, Balachandran Jeyadevan, Yoshinori Kuboki, Kazuyuki Tohji, Fumio Watari : Determination of administered organic/inorganic particles in mice : 8th World Biomaterial Congress 2008 (Amsterdam, 2008年5月28日~6月1日)、同講演予稿集、p. 132、2008
- 21) ○Shigeaki Abe, Chika Koyama, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, and Fumio Watari : Imaging of biodistribution of organic- / inorganic- particles in mice : International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical Application of Fine Particles and Nanotubes" (Sapporo, 2008年6月16日~17日)、同講演予稿集、p. 27、2008
- 22) Mitsue Esaki, ○Shigeaki Abe, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Toshiaki Hosono, Yoshinori Sato, Balachandran Jeyadevan, Yoshinori Kuboki, Manabu Morita, Kazuyuki Tohji, and Fumio Watari : Distribution imaging of magnetic particles in mice compared with magnetic resonance imaging and X-ray scanning analytical microscope : International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical Application of Fine Particles and Nanotubes" (Sapporo, 2008年6月16日~17日)、同講演予稿集、p. 66、2008
- 23) ○Shigeaki Abe, Fumio Watari, and Hiroto Tachikawa : A DFT and MD study on the interaction of carbon nano-materials with metal ions : International Symposium on Multi-scale Simulations of Biological and Soft Materials (MSBSM2008) (Tokyo, 2008年6月18日~20日)、同講演予稿集、p. 62、2008
- 24) ○阿部薫明、小山千佳、赤坂司、宇尾基弘、久保木芳徳、亘理文夫：マウス体内での投与粒子の分布・拡散挙動の可視化：平成20年度日本歯科理工学会北海道・東北支部夏期セミナー(千歳、2008年8月23日~24日)、同講演予稿集、p. 15、2008
- 25) ○阿部薫明、Tarnai Mate, 市川和彦：金属多核型二次元配列基板・デンドリマー・ポリマー合成と多機能：第3回バイオ関連化学合同シンポジウム(東京、2008年9月18~20日)、同講演予稿集、p. 145、2008
- 26) 石田智毅、○阿部薫明、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫：バイオメテックポリマーによる石灰化反応の制御：平成20年度秋期第52回日本歯科理工学会学術講演会(吹田、2008年9月20日~21日)、同講演予稿集、p. 438、2008
- 27) ○阿部薫明、亘理文夫、高田知哉、田地川浩人：ナノカーボン物質と磁性金属イオン(Mn^{2+})との相互作用に関する理論的研究：平成20年度第2回分子科学討論会(福岡国際会議場・福岡)(札幌、2008年9月24日~27日)、同講演予稿集、p. 75、2008
- 28) ○Shigeaki Abe, Chika Koyama, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, and Fumio Watari : Biodistribution of several inorganic micro/ nano particles in mice : 21st International Symposium on Ceramics in Medicine (Bioceramics21) (Buzios, 2008年10月21日~24日)、同講演予稿集、p. 539、2008
- 29) ○Shigeaki Abe, Fumio Watari, Tomoya Takada, and Hiroto Tachikawa : A DFT and MD study on the interaction of carbon nano-materials with metal ions : Korea Japan Joint Forum (Chitose, 2008年10月23日~25日)、同講演予稿集、p. 54、2008
- 30) ○Shigeaki Abe, Tetsu Yonezawa, Chika Koyama, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, and Fumio Watari : Internal distribution behavior of inorganic particles in mice : 21st International symposium of microprocesses and nanotechnology (Fukuoka, 2008年10月27日~30日)、同講演予稿集、p. 292、2008
- 31) ○Shigeaki Abe, Yoshinori Nagoya, Fumio Watari, and Hiroto Tachikawa : A DFT and MD study on the evaporation dynamics of water molecules on carbon nano-materials : 8th International Conference on

Nano-Molecular Electronics (Kobe, 2008年12月16日～18日)、同講演予稿集、p.190、2008

32) 林大輔、○阿部薫明、石田智毅、大和谷恵実、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫、高田知哉：人工酵素モデルを用いた石灰化反応の制御：第21回代用臓器・再生医学研究会(札幌、2009年1月31日)、同講演予稿集、p.9、2009

33) ○阿部薫明、亘理文夫、田地川浩人：成層圏での氷上にトラップされたフロン化合物の光分解メカニズム：北海道支部2009年冬季研究発表会(札幌、2009年2月3日)、同講演予稿集、p.114、2009

34) ○Shigeaki Abe, Yoshinori Nagoya, Fumio Watari, and Hiroto Tachikawa : A DFT and MD study on the evaporation dynamics of water molecules on carbon nano-materials : 5th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (Miyazaki, 2009年3月16日～18日) 同講演予稿集、p.268、2009

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 西村紳一郎、阿部薫明、森山英樹、「フラーレン誘導体」、【国際公開番号】WO2005/061444、2007年7月12日

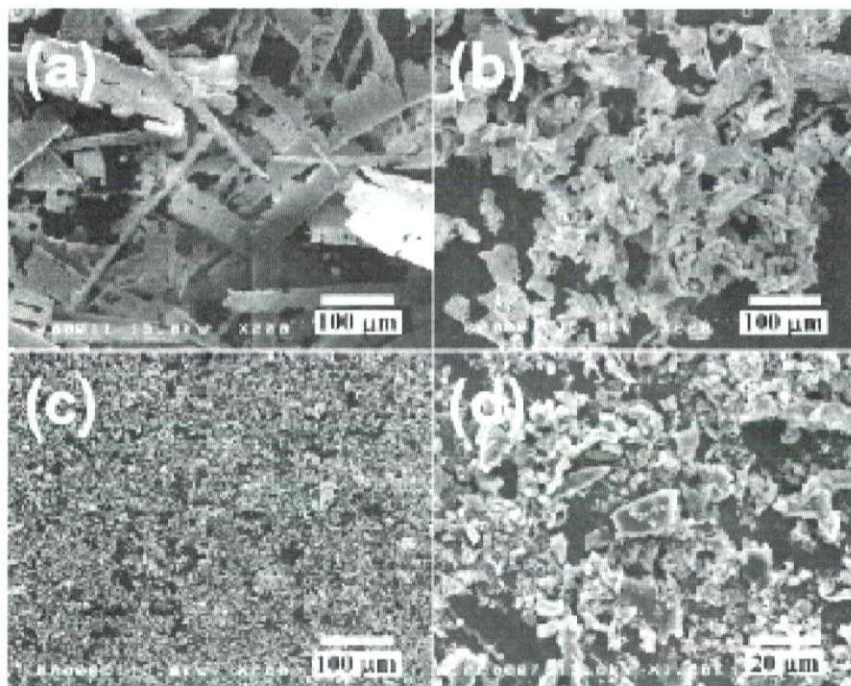


図 1-1

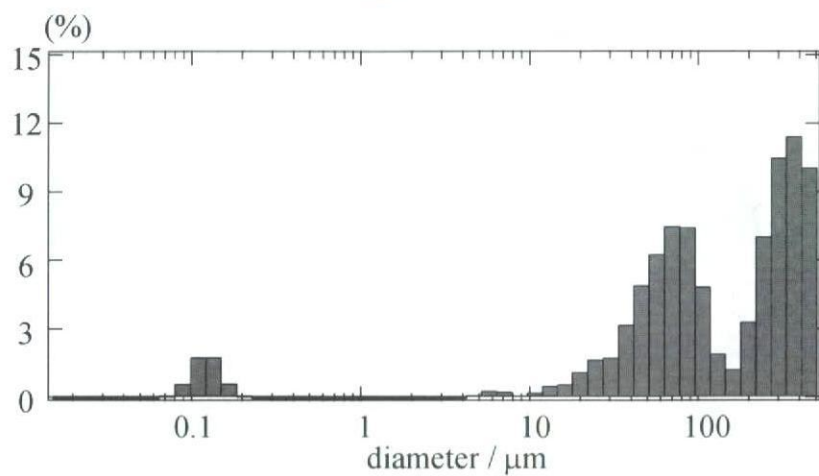


図 1-2

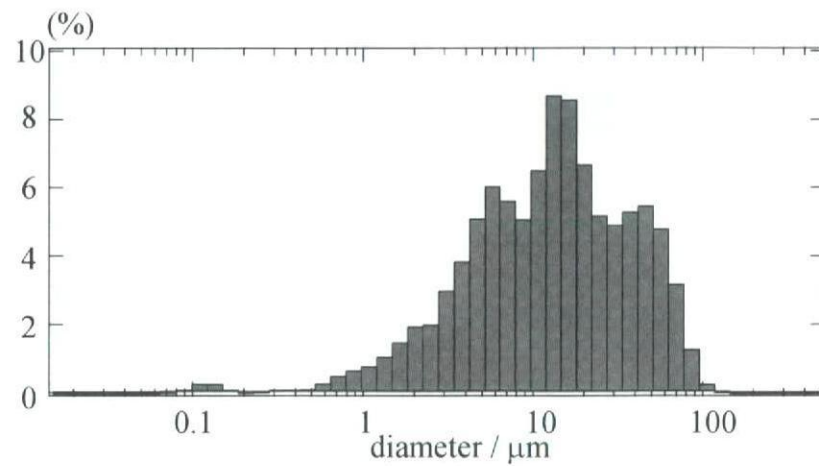


図 1-3

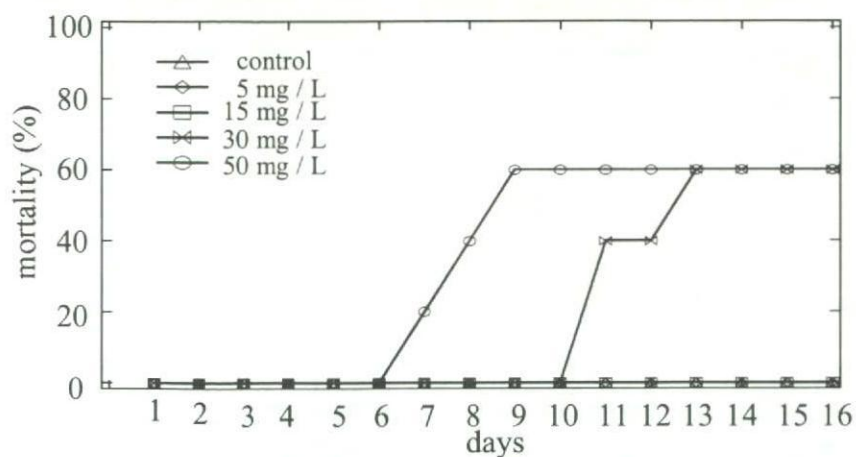


图 2-1

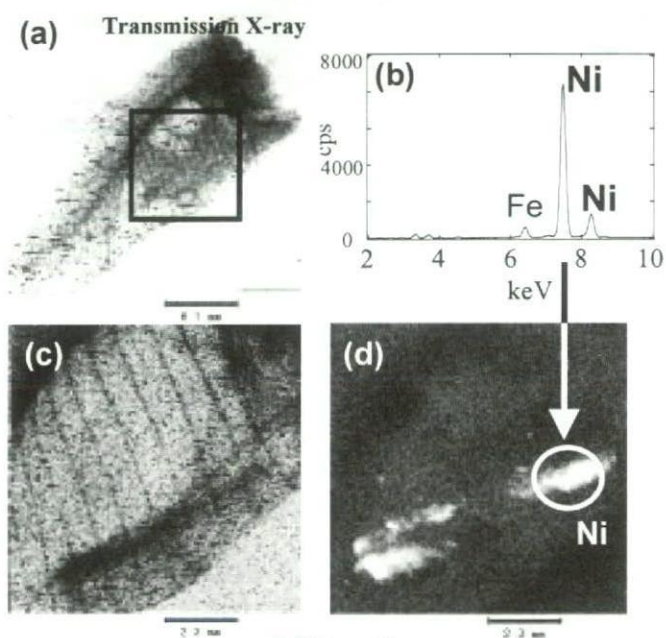


图 2-2

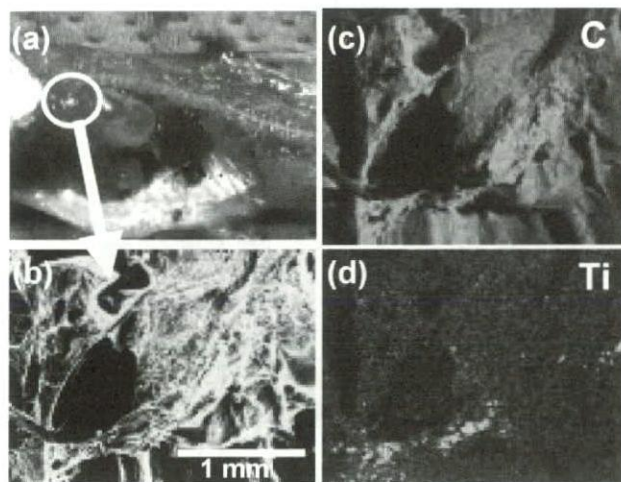


图 2-3

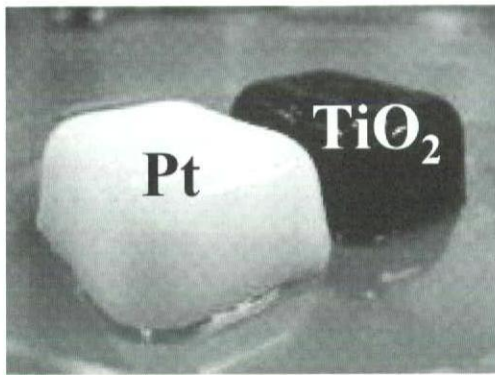


图3-1

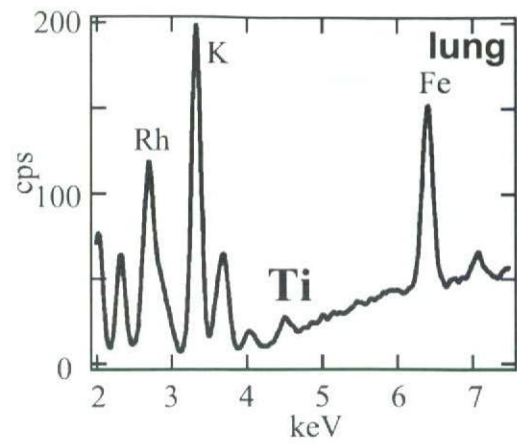


图3-2

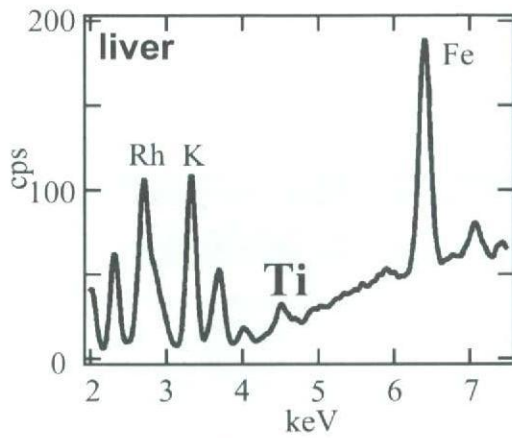


图3-3

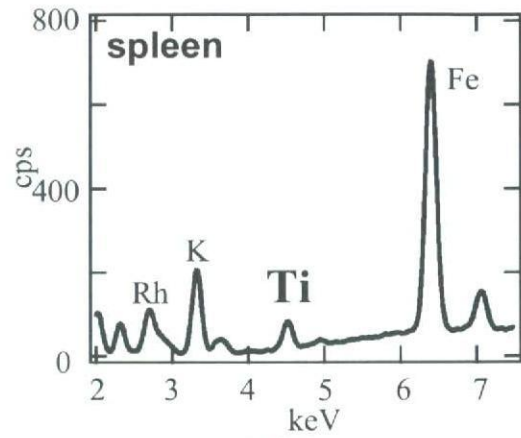


图3-4

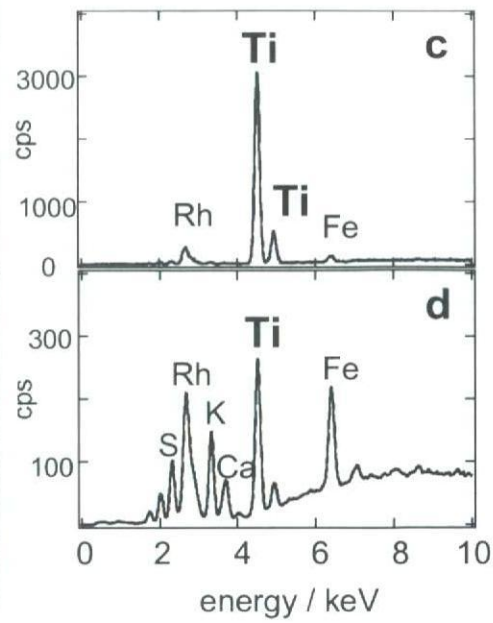
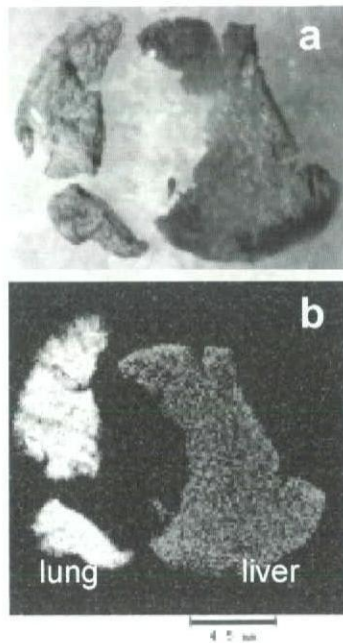


图4-1

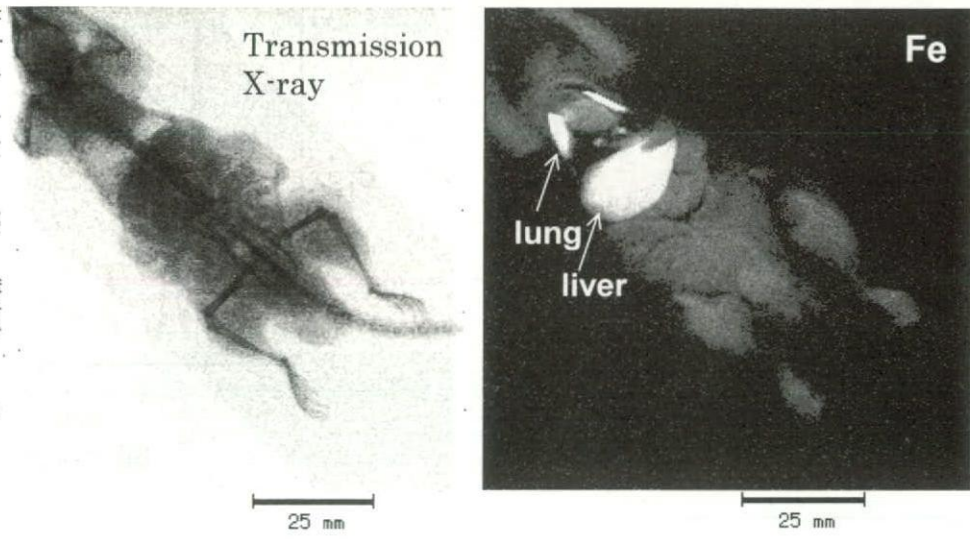


图4-2

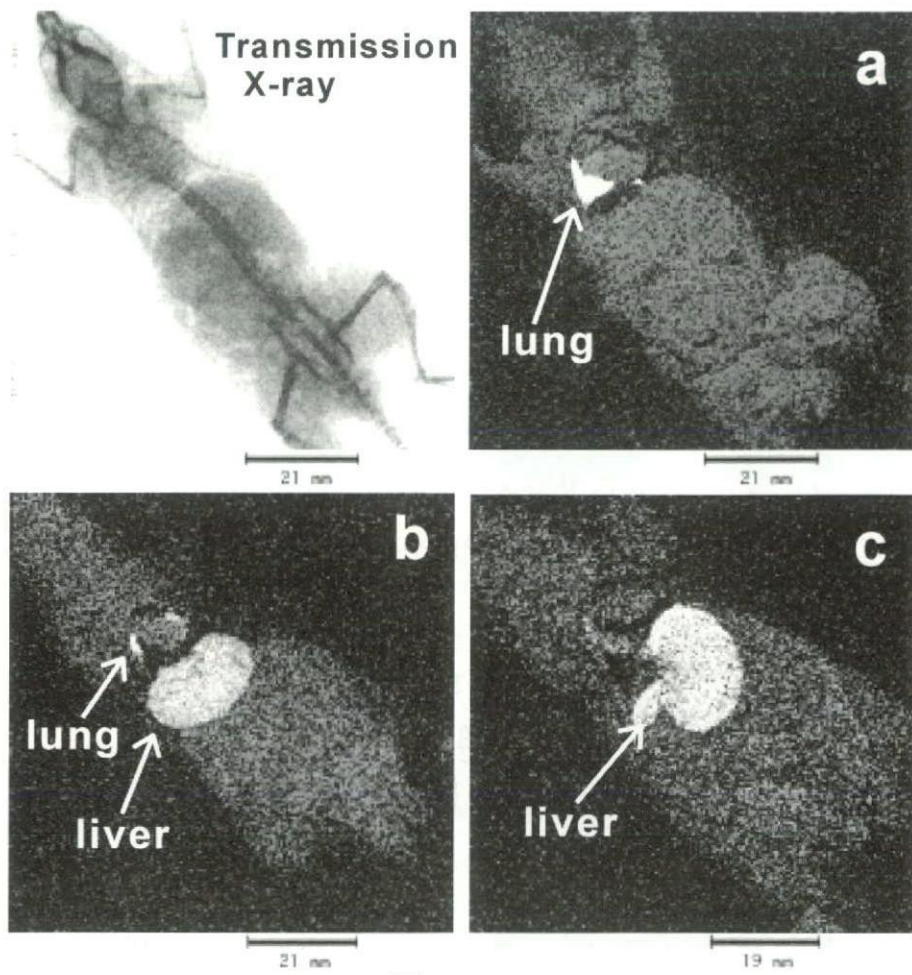
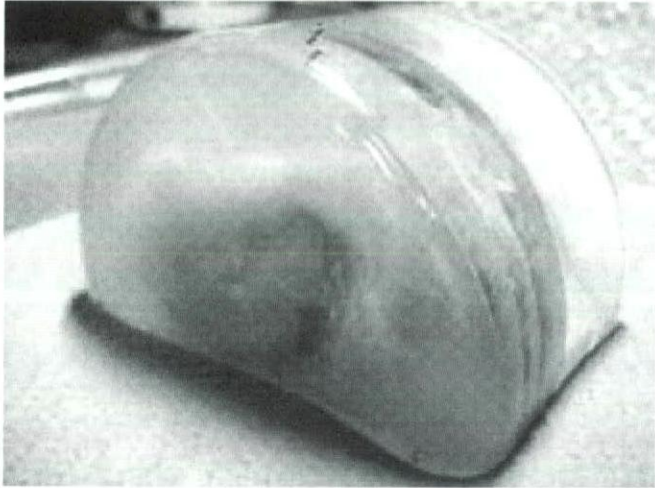
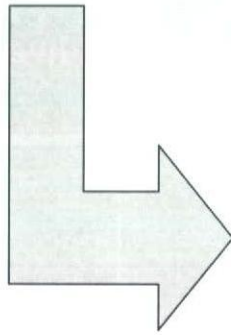


图4-3



TiO₂投与後
樹脂包埋



連続切片化

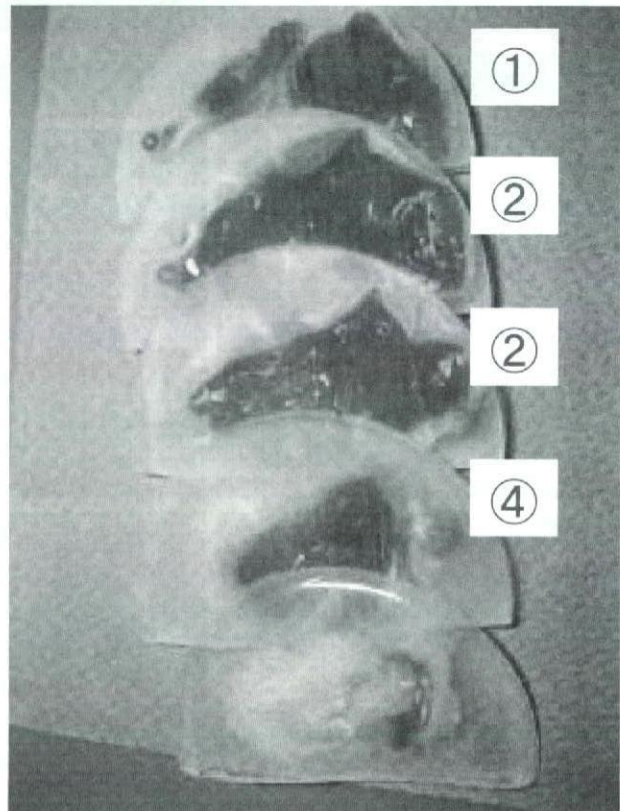


図4-4