

## A. 研究目的

### A-1. 生化学領域における質量分析

ヒトゲノムの解読が完了した2000年以降、ポストゲノム研究としてプロテオミクス解析が広く行われている<sup>16</sup>。プロテオミクスは、生体内で遺伝子から翻訳されて合成される膨大な種類のタンパク質を網羅的に同定・解析することで生体メカニズムの解明や疾患の治療法の開発に役立てようと、タンパク質を扱うプロテオーム解析 (proteome; protein+genome の造語)、ペプチドを扱うペプチドーム解析 (peptidome; peptide+genome)、糖鎖および糖ペプチド、糖タンパク質を扱うグライコーム解析 (glycome; glycogen+genome) を駆使し、生体内の機能に関する解明を試みる学問である<sup>7-10</sup>。その中でも、特に疾患をターゲットに研究を行う“臨床プロテオーム解析”が注目されている<sup>11-13</sup>。この分野での試料は一般に極微量であることが多く、高感度で、かつ得られる情報量の多い分析方法が必要とされており、それを満たす手法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS : Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) が広く使用されている。一般に、正常および疾患検体から採取した血清、血漿や髄液等を簡易精製した後に質量分析を行い、得られた正常/疾患の複数のスペクトルパターンから解析ソフトウェアを用いたクラスター解析およびバイオマーカー (その存在によって正常・疾患を区別できる物質) 探索を行う研究である<sup>14,15</sup>。

近年、発見されたバイオマーカーをターゲットとし、生体組織内でそのマーカーがどの部位に存在するかを2次元的に可視化し、モニタリングおよび解析を行うことができる“イメージング質量分析”が注目されている。この方法は疾患がどの部位にどの程度存在するかを視覚的にとらえることが可能な唯一の方法と言える<sup>16</sup>。これらの研究は、テーラーメイド医療、診断および治療の実現に結びつく、非常に重要な領域である。一方、ナノテクノロジーの進歩も生化学領域に及び、テーラーメイド医療に向けての研究が進められている。選択的部位に薬物投与を目的とするドラッグデリバリーシステム (DDS)、癌治療を目指す磁性粒子ハイパーサーミア、同時にこれらのナノバイオテクノロジーに使用されるナノ材料 (ナノ粒子、フラーレン、カーボンナノチューブ)

の体内への影響を研究するナノトキシコロジー等がさかんに行われており、各種異分野の融合が今後のプロテオミクス研究に必要不可欠である。これらの複合的プロテオミクス研究に質量分析を応用する際には、いくつかの課題が生じる。包括的プロテオーム解析という観点から、測定の高スループット化、再現性向上、および目的物質の比較定量化、またナノテクノロジー分野では投与する薬剤自体の厳密な素材評価、さらに臨床プロテオーム解析では多検体解析への対応等といった問題が挙げられる。それらを解決することに加え、臨床プロテオーム解析で重要なバイオマーカーの位置情報、イメージング質量分析による新規ナノテクノロジーDDS 薬剤の生体内到達部位の位置情報、ナノ材料の代謝による位置情報などの獲得が実現すれば、この画期的技術は、これからのプロテオミクス解析、さらには臨床医療分野やナノテクノロジー分野においても幅広く利用されていくものと期待される。

### A-2. マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

一般に質量分析装置は、試料をイオン化する部分 (イオン源) と、イオンを質量の違いによって分離する部分 (分析計) に大きく分けられる。イオン化法の1つであるMALDI (図1) と分析法の1つであるTOF (図2) を組み合わせたMALDI-TOF-MSは、タンパク質のような分子量100 kDaを超える化合物までも分解させずに測定できるMALDI (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization) のソフトなイオン化と、TOF (Time-Of-Flight) の操作性の良さにより、生体高分子における質量分析法としてMALDI-TOFは一般的なものになりつつある。

MALDIは数あるイオン化法の中の一つであり、文字通り試料がマトリックスに支援されてレーザー脱離・イオン化される方法である。これは、試料そのものにレーザー照射して脱離・イオン化を行う従来のLD (Laser-Desorption:レーザー脱離) に改良を加えた方法と言える。LDとの違いはマトリックスの存在のみであるが、LDではうまく脱離又はイオン化されないことの多い生体高分子試料に対して非常に有効な手法である。図1に示すように、試料・マトリックス混合結晶に高密度なレーザー光 (窒素レーザー (337 nm) が用いられることが多い) が照



射されると、まずはマトリックスがレーザーの光子を吸収して励起状態に達し、それと同時に結晶の温度が上昇して試料もろとも脱離（昇華）する。これによって試料単体ではうまく脱離しないものでも「マトリックス支援」によって脱離されることになる。次に、蒸発した試料は高い励起状態にあるマトリックスによって化学的イオン化を受ける。その過程はいくつか考えられるが、多くの場合はマトリックス分子から解離したプロトンが試料分子に移動して見かけ上イオン化された状態になる（擬分子イオン化）。

TOFとは「飛行時間型」のことで、磁場型やイオントラップと並ぶイオン分離法の一つである。その概略を図2に示す。レーザー照射によって生成されたイオンを電場によって加速する。この時に低分子量のイオンは速く、高分子量のイオンは遅く飛行するため、分子量ごとに飛行時間が異なることになる（これは運動エネルギーの方程式、 $E=(1/2)mv^2$ で単純に理解できる。Eは電場の大きさ、mはイオンの質量、vはイオンの速度で決まるため、イオンの質量数とは関係なく一定と考えることができる。とすれば、mが小さい場合はvが大きく、mが大きい場合はvが小さくなくてはならない。最終的にリニア検出器でイオンを検出することで飛行時間を測定し、飛行時間から換算することで分子量を求める（リニアモード測定）。また、反射場（リフレクタ）を用いてイオンを反射させ、飛行しているイオンの時間分布を収束させて高分解能測定を行う場合もある（リフレクタモード）。さらに最近では、一度加速したイオンを再度加速することでMS/MS測定をよりハイスループット・高感度・高精度で行うためのTOF/TOFと呼ばれる装置も開発されている。

### A-3. イメージング質量分析

イメージング質量分析は1996年から研究されるようになった、非常に新しい分析方法である。分析部には一般にMALDI-TOF-MSが用いられ、ターゲットプレートに貼り付けられた薄膜試料、もしくは薄膜状に調製された試料をXY方向に走査するようにレーザーを照射して測定を行う。結果は、測定されたスペクトルの各分子量について、その種類および量をそれぞれ色およびその濃淡で表示させ、イメージングとして出力する。原理的には薄膜でさえあ

れば試料は生体組織に限定されるものではない。生体組織を例にとると、図3のように試料は生体組織を凍結し、マイクロームによって5.0～30μm程度にスライスした凍結切片を用いる。これを導電性のスライドガラス等に固定し、洗浄および乾燥させてから測定に用いる。マトリックスは、測定目的に応じて不連続的に添加、もしくは、スプレーによって均一に添加し、測定を行う。原理的には非常に簡便な装置であるが、イメージング質量分析を行うためには、測定用のソフトウエアおよび2次元に可視化するためのソフトウエアの2つを組み合わせることが不可欠である。Vanderbilt大学のR. M. Caprioliらは、パーキンソン病<sup>17</sup>、脳腫瘍<sup>18</sup>、肺がん<sup>19</sup>、大腸がん<sup>20</sup>、前立腺がん<sup>21</sup>等の腫瘍組織を用いたイメージングや、バイオマーカーの探索を意欲的に進めている。彼らはサンプルの前処理方法等の基礎研究も行っており、現在この分野で世界的にもトップを走るグループと言える<sup>22,23</sup>。Caprioliらによると、図4に示すように、測定は目的によって「プロファイリングモード」および「イメージングモード」で行う。プロファイリングモードでは、マトリックスを不連続的にスポットし、各スポット内で得られるスペクトルの差異からその部位に特有のバイオマーカーを探索することを目的とする。イメージングモードでは、組織切片上にマトリックスを均一に噴霧し、必要な解像度で連続的に測定を行い、結果を2次元に可視化することを目的としている。

### A-4. ナノ粒子の体内動態可視化と本研究の目的

ナノテクノロジー分野において、 $C_{60}$ はその生理活性機能が期待され、様々な研究が行われている。XSAM、SEM-EDX、EPMAなどの測定装置では、炭素で構成されているフラーレン( $C_{60}$ )を有機化合物である生体内で検出することは不可能である。したがって、放射性元素によるラベルリングすることで生体内代謝機能が調べられているが、放射性元素を扱うには設備が必要であり、容易な実験ではない。フラーレンは非常に安定な構造( $sp^2$ 構造)を有することが知られており、また化学修飾を行うことによって水溶化も可能である。修飾部位は $sp^3$ 混成軌道による結合となるため、容易に解離することが予測される。つまり質量分析においても、水溶化フラーレンのようなフラーレン誘導体はイオン化の段階で



解離を起こし、もとの完全な状態を観測することはできない。解離して修飾部位の外れたフラレーンとその開裂イオンのみが観測されることがすでに実証されている。そこで、選択的標識を有したフラレーン誘導体を用いることによる、間接的モニタリングの実現を図る。つまり、目的のマーカーに選択的に結合するような水溶化フラレーンを設計して生体組織に導入すると、マーカー部分だけにフラレーン誘導体が結合する。マーカーが存在した部分のみからイオン化が起こり、解離イオンであるフラレーンを測定することにより、生体内のどの部位に濃縮しているのかイメージングを行うことが可能になる(図5)。

21世紀高齢社会における健康福祉増進、クオリティー・オブ・ライフ実現のためには、ナノテクノロジーの貢献が不可欠である。とりわけ、ドラッグデリバリーシステム(DDS)や癌治療である磁性粒子温熱療法(ハイパーサーミア)をはじめとするナノマテリアルの人体へのバイオ応用には、あらかじめ起こり得る生体反応と条件を周到に把握する必要がある。一方で、ナノテクノロジーの発展による金属ナノ粒子や、フラレーン、カーボンナノチューブをはじめとするナノカーボン材料の高機能性と共に為害性も増進する可能性が挙げられている。これまでにフラレーンの毒性評価の研究は数多くされてきた<sup>24-28</sup>。オオクチバスをフラレーン( $C_{60}$ )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>29</sup>、生体内でのフラレーンの代謝経路は非常に注目を浴びている。しかし、フラレーンの代謝経路の測定は、フラレー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>30</sup>。もしフラレーンが質量イメージング分子として機能すれば、フラレー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。そこで、本研究班では「イメージング質量分析を用いたラット生体内の水溶化フラレーンの可視化に関する研究」の研究を行った。濃度3.0 mg/mLの $C_{60}(\text{OH})_n$ 生理活性水1.0 mL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 $C_{60}(\text{OH})_n$ 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、臓器内での $C_{60}(\text{OH})_n$ の存在を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### B-1. Nitrocellulose Membrane 上における水溶化フラレーンの測定

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

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

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

### B-2. $C_{60}(\text{OH})_n$ を注入したラットの各臓器切片の測定

精製された $C_{60}(\text{OH})_n$ 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 $\text{N}_2$ レーザーを使用していたが、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. 結果と考察

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

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

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

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

とから、確かに  $720\text{ m/z}$  がフラウレンであり、この図から示されるように、組織切片に添加した水溶性フラウレン  $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  からの解離イオンである  $\text{C}_{60}$  を検出することに成功し、間接的なモニタリングシステムの有効性が明らかになった。

図8にラットの肝臓組織切片を使用した糖鎖水溶化フラウレンのモニタリングの検討結果を示す。図8a)、8b) はグルコース二量体水溶化フラウレン  $\text{Glc}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$ 、ガラクトース二量体水溶化フラウレン  $\text{Gla}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$  を注入した肝臓組織の切片写真であり、図8c)、8d) はそれぞれの  $720\text{ m/z}$  のイメージング像である。どちらの肝臓組織切片にも添加した糖鎖付加水溶化フラウレンからの解離イオンである  $\text{C}_{60}$  を検出することに成功している。また、分子量  $1000\sim 20000\text{ Da}$  の範囲でイメージングを行った場合、イメージング像が全く見られなかったことから、組織由来のタンパク質等の物質はイオン化していないことがわかる。これはマトリックスを使用していないために、フラウレン以外の物質がイオン化できないためである。図9はグルコース二量体水溶化フラウレン  $\text{Glc}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$  を注入した肝臓組織の  $720\text{ m/z}$  のイメージング像の拡大図である。丸で囲っている部分にグルコース二量体水溶化フラウレンが存在した場所であるが、組織内で凝集している可能性がある。これは、ラットから切除した肝臓に水溶化フラウレン、糖鎖付加水溶化フラウレンを直接注入したものであるため、局所的な凝集効果によるものと考えられる。

### C-3. 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  $\text{N}_2$  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10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11)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 $\mu$ mであり、ターゲットプレート移動ステップは5 $\mu$ 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<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>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-4. C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>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12a~12dはC<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>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13)。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14)。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15)、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16)。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17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18)。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。

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)。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。

#### D. 結論

本研究を通して、以下の2つのことを明らかにした:

##### D-1. 質量イメージング分子としてのフラレン

本年度は、イメージング質量分析によりフラレンの体内動態可視化を試み、フラレンの生体内での代謝分布評価法としての予備実験を行った。組織切片に添加した水溶性フラレン(C<sub>60</sub>(OH)<sub>n</sub>)、糖鎖



化付加型水溶化フラレーン（グルコース二量体  $\text{Glc}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$ 、ガラクトース二量体  $\text{Gla}_2\text{-C}_{60}(\text{OH})_n$ ）からの解離イオンである  $\text{C}_{60}$  を検出することに成功し、間接的なモニタリングシステムの有効性が明らかになった。今回開発した選択的標識を有する水溶性フラレーン誘導体の間接的モニタリングシステムは、その感度と選択性において非常に優れているものであるという知見を得た。

#### D-2. ラット体内での水溶化フラレーンの可視化

ラットに濃度 3.0 mg/mL の  $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  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、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  の各臓器（脳、肺、腎臓、肝臓）に対する  $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  の可視化を行った。 $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  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、 $\text{C}_{60}$ （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、 $\text{C}_{60}$  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  $\text{C}_{60}$  がイメージングされていることから、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  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  $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  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を描いた結果、優位差のある曲線が得られ、確かに  $\text{C}_{60}$  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、 $\text{C}_{60}$  が肝臓組織に元々存在しないものであることを示し、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  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、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  の臓器内の可視化に成功した。

#### E. 文献

- 1) J. R. Yates III et al, *Anal. Biochem.*, 1993, **214**, 397.
- 2) A. Shevchenko et al, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 850.
- 3) D. J. C. Pappin et al, *Curr. Biol.*, 1993, **3**, 327.
- 4) M. Mann et al, *Biol. Mass Spectrom.*, 1993, **22**, 338.
- 5) P. James et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **1**, 58.
- 6) W. J. Henzel et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, **90**, 5011.
- 7) D. F. Hochstrasser, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1998, **36**, 825.
- 8) M. J. Page et al, *Drug Discovery Today*, 1999, **4**, 55.
- 9) W. P. Blackstock, M. P. Weir, *TIBTECH*, 1999, **17**, 121.
- 10) C. D. O'Connor et al, *Methods Microbiol.*, 1998, **27**, 191.
- 11) E. F. Petricoin et al, *Lancet*, 2002, **359**, 572.
- 12) J. D. Wulfkuhle et al, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**, 267.
- 13) J. Villanueva et al, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1560.
- 14) M. Merchant et al, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 1164.
- 15) D. F. Ransohoff, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, **97**, 315.
- 16) R. M. Caprioli et al, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 4751.
- 17) J. Pierson et al, *J. Proteome Res.*, 2004, **3**, 289.
- 18) S. A. Schwartz et al, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 981.
- 19) K. Yanagisawa et al, *Lancet.*, 2003, **362**, 433.
- 20) P. Chaurand et al, *Proteomics*, 2001, **1**, 1320.
- 21) N. Masumori et al, *J. Cancer Res.*, 2001, **61**, 2239.
- 22) S. A. Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.*, 2003, **38**, 699.
- 23) J. L. Norris et al, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6642.
- 24) W. A. Scrivens et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4517-4518, (1994).
- 25) L. L. Dugan et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 9434-9439, (1997).
- 26) D. W. Cagle et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 5182-5187, (1999).
- 27) P. Rajagopalan et al, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2262-2265, (1996).
- 28) C. M. Sayes et al, *Nano Lett.*, **4**, 1881-1887, (2004).
- 29) E. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.*, **112**,

1058-1062 (2004).

30) S. Yamago et al, *Chem. Biol.*, **2**, 385-389, (1995).

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Go Yamamoto, **Yoshinori Sato**, Toru Takahashi, Mamoru Omori, Akira Okubo, **Kazuyuki Tohji**, Toshiyuki Hashida, "Mechanical properties of binder-free single-walled carbon nanotube solids", *Scripta Materialia*, **54**, 299-303 (2006).
2. Naofumi Aoki, Atsuro Yokoyama, Yoshinobu Nodasaka, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, **Yoshinori Sato**, **Kazuyuki Tohji**, Fumio Watari, "Strikingly Extended Morphology of Cells Grown on Carbon Nanotubes", *Chem. Lett.* **35**, 508-509 (2006).
3. Mayuko Ushiro, Kanae Uno, Takashi Fujikawa, **Yoshinori Sato**, **Kazuyuki Tohji**, Fumio Watari, Wang-Jae Chun, Yuichiro Koike, Kiyotaka Asakura, "X-ray absorption fine structure (XAFS) analyses of Ni species trapped in graphene sheet of carbon nanofibers", *Phys. Rev. B* **73**, 144103 (2006).
4. Go Yamamoto, **Yoshinori Sato**, Toru Takahashi, Mamoru Omori, Toshiyuki Hashida, Akira Okubo, **Kazuyuki Tohji**, "Single-walled carbon nanotube-derived novel structural material", *J. Mater. Res.*, **21**, 1537-1542 (2006).
5. Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, **Yoshinori Sato**, **Kazuyuki Tohji**, "Apatite formation on carbon nanotubes", *Material science & Engineering C* **26**, 675-678 (2006).
6. Yutaka Maeda, **Yoshinori Sato**, Masahiro Kako, Takatsugu Wakahara, Takeshi Akasaka, Jing Lu, Shigeru Nagase, Yumiko Kobori, Tadashi Hasegawa, Kenichi Motomiya, **Kazuyuki Tohji**, Atsuo Kasuya, Dan Wang, Dapeng Yu, Zhengxiang Gao, Rushan Han, Hengqiang Ye, "Preparation of Single-Walled Carbon Nanotubes-Organosilicon Hybrids and Their Enhanced Field Emission Properties", *Chemistry of Materials* **18**, 4205-4208 (2006).
7. Shin-ichi Ogino, **Yoshinori Sato**, Go Yamamoto, Kenichiro Sasamori, Hisamichi Kimura, Toshiyuki Hashida, Kenichi Motomiya, Balachandran Jeyadevan, **Kazuyuki Tohji**, "Relation of the Number of Cross-Links and Mechanical Properties of Multi-Walled Carbon Nanotube Films Formed by a Dehydration Condensation Reaction", *J. Phys. Chem. B*, **110**, 23159-23163 (2006).
8. D. Kodama, K. Shinoda, K. Sato, **Y. Sato**, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Synthesis of Fe-Co alloy particles by modified polyol process", *IEEE Trans. Magn.*, **42**, 2796-2798 (2006).
9. B. Jeyadevan, K. Shinoda, R. J. Justin, T. Matsumoto, K. Sato, **Y. Sato**, **K. Tohji**, "Polyol process for Fe-based hard (fct-FePt) and soft (FeCo) magnetic nanoparticles", *IEEE Trans. Magn.*, **42**, 3030-3035 (2006).
10. D. Kodama, K. Shinoda, K. Sato, K. Sato, Y. Konno, R. J. Joseyphus, K. Motomiya, H. Takahashi, T. Matsumoto, **Y. Sato**, **K. Tohji**, B. Jeyadevan, "Chemical Synthesis of Sub-micrometer- to Nanometer-Sized Magnetic FeCo Dice", *Adv. Mater.*, **18**, 3154-3159 (2006).
11. 石黒三岐雄, **佐藤義倫**, **田路和幸**, 我妻和明, "高周波誘導結合プラズマ発行分光分析法によるカーボンナノチューブ中の金属元素の定量", *分析化学* **55**, 117-120 (2006).
12. **佐藤義倫**, 宇尾基弘, 横山敦郎, 柴田健一郎, 巨理文夫, **田路和幸**, "カーボンナノチューブと金属内包カーボンナノカプセルの毒性評価", *表面*, **44**, 87-103 (2006).
13. **田路和幸**, **佐藤義倫**, "生体組織反応性に及ぼすカーボンナノチューブの純度と形態の影響", *バイオマテリアル 一 生体材料*, **24**, 333-344 (2006).
14. 渥美 崇, バラチャンドラン ジャヤデワン, **佐藤義倫**, **田路和幸**, "磁性粒子を発熱体とした温熱療法の基礎的検討 その1 一温熱療法に適した磁性粒子の理論および実験的検討一", *日本応用磁気学会誌*, **30**, 555-560 (2006).
15. **佐藤義倫**, 横山敦郎, 柴田健一郎, 巨理文夫, **田路和幸**, "カーボンナノチューブの安全性", *炭素*, **225**, 364-372 (2006).
16. **佐藤義倫**, "カーボンナノチューブの毒性評価", *カーボンナノチューブの機能・複合化の最新技術*, CMC 出版 (2006).
17. G Yamamoto, K. Yokomizo, M. Omori, **Y. Sato**, K. Motomiya, T. Hashida, T. Takahashi, A. Okubo, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Polycarbosilane-derived SiC/single-walled carbon nanotube nanocomposites", *Nanotechnology*, **18**, 145614-145618 (2007).
18. R. Justin Joseyphus, D. Kodama, T. Matsumoto, **Y. Sato**, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Role of polyol in the synthesis of Fe particles", *J. Magn. Magn. Mater.* **310**, 2393-2395 (2007).
19. D. Kodama, K. Shinoda, K. Sato, **Y. Sato**, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Synthesis of size-controlled Fe-Co alloy nanoparticles by modified polyol process", *J. Magn. Magn. Mater.* **310**, 2396-2398 (2007).
20. T. Atsumi, B. Jeyadevan, **Y. Sato**, K. Tohji, "Heating efficiency of magnetite particles exposed to AC magnetic field", *J. Magn. Magn. Mater.* **310**, 2841-2843 (2007).
21. M. Uo, H. Kachi, T. Akasaka, F. Watari, **Y. Sato**, K. Motomiya, **K. Tohji**, "The Purity and Thermal Stability in Air of Metal-Encapsulating Carbon Nanocapsules (MECNs)", *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.*, **15**, 303-309 (2007).



22. Y. -S. Park, A. Kasuya, A. Dmytruk, N. Yasuto, M. Takeda, N. Ohuchi, **Y. Sato**, **K. Tohji**, M. Uo, F. Watari, "Concentrated Colloids of Silica-Encapsulated Gold Nanoparticles: Colloidal Stability, Cytotoxicity, and X-ray Absorption", *J. Nanosci. Nanotechnol.* **7**, 2696-2708 (2007).
23. S. Iwata, **Y. Sato**, K. Nakai, S. Ogura, T. Okano, M. Namura, A. Kasuya, **K. Tohji**, K. Fukutani, "Novel method to evaluate the carbon network of single-walled carbon nanotubes by hydrogen physisorption", *J. Phys. Chem. C*, **111**, 14937-14941 (2007).
24. F. Watari, K. Tamura, A. Yokoyama, K. -I. Shibata, T. Akasaka, B. Fugetsu, K. Asakura, M. Uo, Y. Totsuka, Y. Sato, K. Tohji, "Biochemical and Pathological Responses of Cells and Tissue to Micro- and Nanoparticles from Titanium and other Materials", *Handbook of Biomaterialization -Medical and Clinical Aspects-*, Mattha Epple and Edmund Baeuerlein editors, 127-144 WILEY-VCH, Verlag, GmbH & Co.KgaA (2007).
25. 佐藤義倫, "カーボンナノチューブのリスク評価の動向", *応用物理*, **76**, 1154-1158 (2007).
26. 佐藤義倫, 田路和幸, "カーボンナノチューブ", ナノ粒子の有害性評価とリスク対策, 技術情報協会 (2007).
27. A. Takahashi, T. Ishiyama, H. Takahashi, **Y. Sato**, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Effect of morphology of CdS thin film on the photocatalytic decomposition of hydrogen sulfide", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 119-122 (2007).
28. D. Kodama, K. Shinoda, K. Sato, **Y. Sato**, **K. Tohji**, B. Jeyadevan, "Morphology control of FeCo alloy particles synthesized by polyol process", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 126-129 (2007).
29. G. Yamamoto, T. Hashida, K. Adachi, **Y. Sato**, **K. Tohji**, "Evaluation of tribological properties of binder-free single-walled carbon nanotube solids for solid lubrication application", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 130-134 (2007).
30. T. Hosono, H. Takahashi, **Y. Sato**, **K. Tohji**, B. Jeyadevan, "Magnetite nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia using modified oxidation method", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 135-138 (2007).
31. I. Waki, **Y. Sato**, K. Motomiya, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Efficient synthesis of gadolinium carbide encapsulating carbon nanocapsules", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 139-142 (2007).
32. M. Uebayashi, Y. Sawada, **Y. Sato**, T. Itoh, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Characterization of Pt-based transition metal alloy electrodes for PEFC", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 162-165 (2007).
33. N. Tsuchiya, **Y. Sato**, N. Aoki, A. Yokoyama, F. Watari, K. Motomiya, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Evaluation of multi-walled carbon nanotube scaffolds for osteoblast growth", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 166-169 (2007).
34. S. Ogino, **Y. Sato**, G. Yamamoto, K. Sasamori, H. Kimura, T. Hashida, K. Motomiya, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Estimation of the number of cross-links of multi-walled carbon nanotube films formed by a dehydration condensation reaction", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 175-178 (2007).
35. S. Yokoyama, H. Takahashi, **Y. Sato**, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Effect of crystalline structure of Cd(OH)<sub>2</sub> precursor on the photocatalytic activity of stratified CdS", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 179-181 (2007).
36. **Y. Sato**, A. Yokoyama, K. Motomiya, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Preparation of size-controlled hat-stacked carbon nanofibers", *Proceedings of 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, AIP Conference Proceedings* **898**, 186-189 (2007).
37. R. J. Joseyphus, K. Shinoda, **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).
38. 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).
39. 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).
40. **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).
41. **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).
42. **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).
  43. 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).
  44. 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).
  45. 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).
  46. B. Aissa, 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).
  47. **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).
  48. **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).
  49. 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. **Yoshinori Sato**, Genta Sato, **Kazuyuki Tohji**, Rikizo Hatakeyama, “Control of an arc peripheral reactive plasma growing radial single-walled carbon nanotubes”, *The 6th International Conference on Reactive Plasmas and 23rd Symposium on Plasma Processing*, Scientific Program P27, Matsushima, Miyagi, Japan, 2006. 1. 25.
  2. **Yoshinori Sato**, Takuya Uchida, Naofumi Aoki, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, Atsuro Watari and **Kazuyuki Tohji**, “Cell proliferation of osteoblasts on carbon nanotubes with different diameter”, 7th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, Abstract P194, Nagano, Japan, 2006. 6. 20.
  3. **Y. Sato**, A. Yokoyama, **K. Tohji**, “Preparation of Size Controlled Hat-Stacked Carbon Nanofibers, and Their Cytotoxicity in Rat”, 4th International Workshop on WATER DYNAMICS, P56, Sendai, Japan, 2006.11.7.
  4. **佐藤義倫**, “Cytotoxicity of Carbon Nanotubes —カーボンナノチューブの細胞毒性—”, 2006 年度炭素学会 2 月セミナー ナノカーボンの未来を探る —用途開発の最先端と生体への影響評価—, 東京都、文京区 2006. 2. 3.
  5. **佐藤義倫**, **田路和幸**, 菲澤 崇, “イメージング質量分析を用いた生体組織評価 (1)”, 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」, 第 1 回研究発表会要旨集, P9-14 北海道、支笏湖 2006. 5. 16.
  6. **佐藤義倫**, 内田拓哉, 土屋直実, 青木尚史, 赤坂 司, 宇尾基弘, 本宮憲一, B. ジャヤデワン, 亘理文夫, **田路和幸**, “異なる直径を持つ多層カーボンナノチューブスキャホールド上の骨芽細胞の増殖”, 第 31 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集, P112, 三重県、津市 2005. 7. 12.
  7. **佐藤義倫**, “カーボンナノチューブ・名のカーボン材料における体内挙動。毒性評価の最新研究動向”, セミナー番号 608203, 技術情報協会、東京都、品川区 2006. 8. 21.
  8. **佐藤義倫**, “カーボンナノチューブの体内挙動”, セミナー番号 611494, 技術情報協会、東京都、品川区 2006. 11. 24
  9. **佐藤義倫**, **田路和幸**, “カーボンナノチューブの細胞毒性に関する純度と形態の影響”, 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, P70 東京都、千代田区 2006. 11. 28.
  10. **佐藤義倫**, “カーボンナノチューブの毒性に関する理解はどこまで進んだか”, 平成 18 年度 第 4 回 カーボンナノ材料研究会、大阪市、北区 2007. 2. 2.
  11. **佐藤義倫**, 土屋直実, 青木尚史, 横山敦郎, 亘理文夫, **田路和幸**, “多層カーボンナノチューブスカフォールドにおける骨芽細胞増殖因子の探索”, 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」, 第 2 回研究発表会要旨集, P11 徳島県、鳴門市 2007. 3. 1.
  12. **佐藤義倫**, **田路和幸**, 菲澤 崇 “イメージング質量分析を用いた生体組織評価 (2)”, 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」, 第 2 回研究発表会要旨集, P65 徳島県、鳴門市 2007. 3. 1.
  13. **Y. Sato**, S. Ogino, G. Yamamoto, K. Sasamori, H. Kimura, T.



- Hashida, K. Motomiya, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Relation of the Number of Cross-links and Mechanical Properties of Multi-Walled Carbon Nanotube Films Formed by a Dehydration Condensation Reaction", 2007 MRS Spring Meeting, Program & Exhibit Guide P218, San Francisco, California, US, 2007. 4.10.
14. **Y. Sato**, K. Hasegawa, N. Ito, K. Motomiya, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Preparation and Properties of Rubber Filled with Radial Single-walled Carbon Nanotubes", 2007 MRS Fall Meeting, Program & Exhibit Guide P321, Boston, Massachusetts, US, 2007. 11.29.
15. **佐藤義倫**, "カーボンナノチューブの毒性に関する理解はここまで進んだか", 平成 18 年度 第 4 回 カーボンナノ材料研究会, 大阪市, 北区 2007. 2. 2.
16. **佐藤義倫**, 土屋直実, 青木尚史, 横山敦郎, 巨理文夫, **田路和幸**, "多層カーボンナノチューブスカフォールドにおける骨芽細胞増殖因子の探索", 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」, 第 2 回研究発表会要旨集, P11 徳島県, 鳴門市 2007. 3. 1.
17. **佐藤義倫**, **田路和幸**, 菰澤 崇, "イメージング質量分析を用いた生体組織評価 (2)", 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」, 第 2 回研究発表会要旨集, P65 徳島県, 鳴門市 2007. 3. 1.
18. **佐藤義倫**, 長谷川研二, 伊藤信幸, 本宮憲一, B. ジャヤデワン, **田路和幸**, "放射状単層カーボンナノチューブを補強材としたゴムの調製と特性", 第 33 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集, P219, 福岡県, 福岡市 2007. 7. 13.
19. **佐藤義倫**, 脇 一平, 名村 優, 大久保 昭, 木村久道, 本宮憲一, パラチャンドラン ジャヤデワン, **田路和幸**, "LaC<sub>2</sub>内包カーボンナノカプセル固化体の作製", 第 4 回「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」講演要旨集, P19, 東京都, 江戸川区 2007. 8. 1.
20. **佐藤義倫**, 久保拓也, 菰澤 崇, 赤坂 司, 横山敦郎, **田路和幸**, "イメージング質量分析を用いた生体組織観察 (3) -水溶性 C<sub>60</sub>の精製-", 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」, 第 3 回研究発表会要旨集, P9 北海道, 登別市 2007. 11. 12.
21. **佐藤義倫**, 土屋直実, 内田拓哉, 本宮憲一, パラチャンドラン ジャヤデワン, **田路和幸**, 青木尚史, 巨理文夫, 横山敦郎, "異なる直径を持つ多層カーボンナノチューブ上での骨芽細胞の細胞増殖因子", 第 18 回日本 MRS 学術シンポジウム講演要旨集, P307, 東京都, 千代田区 2007. 12. 8.
22. **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.
23. 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.
24. **Y. Sato**, I. Waki, M. Namura, K. Motomiya, B. Jeyadevan, **K. Tohji**, "Solidification of Lanthanum Carbide-Encapsulating Carbon Nanocapsule/LaB<sub>6</sub> composites", ChemOnTubes 2008, International meeting on the chemistry of nanotubes: science and applications, Book of abstract P131, Zaragoza, Spain, 2008. 4. 7.
25. **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.
26. 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.
27. **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.
28. **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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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」



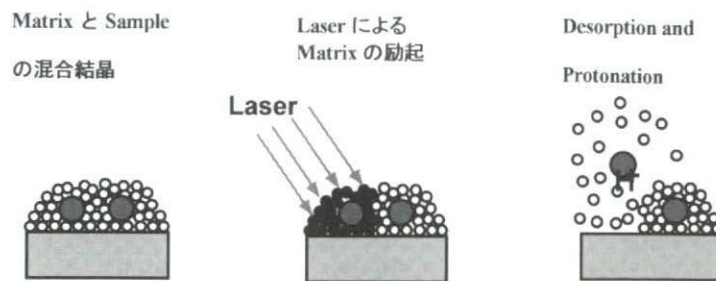


図 1 MALDI の概略図.

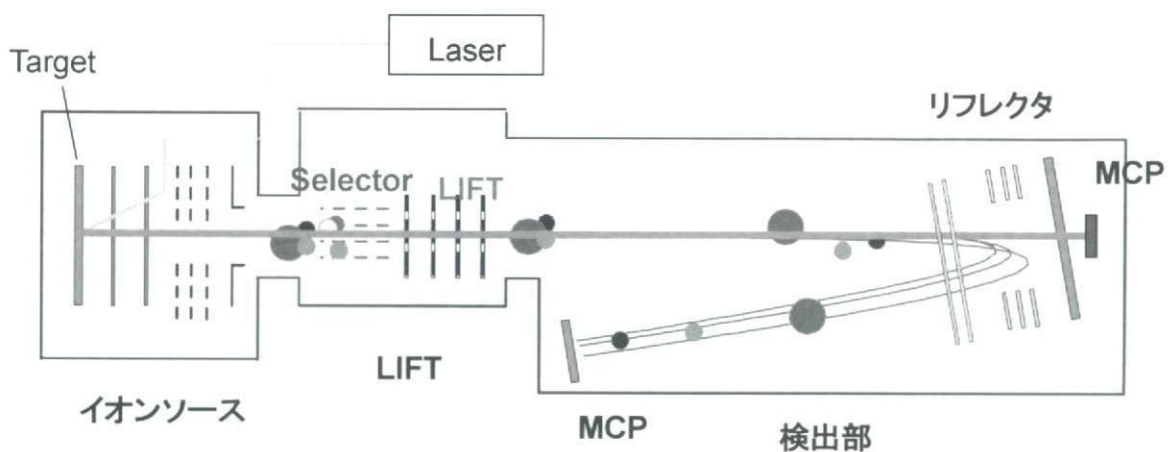


図 2 TOF-MS の概略図.

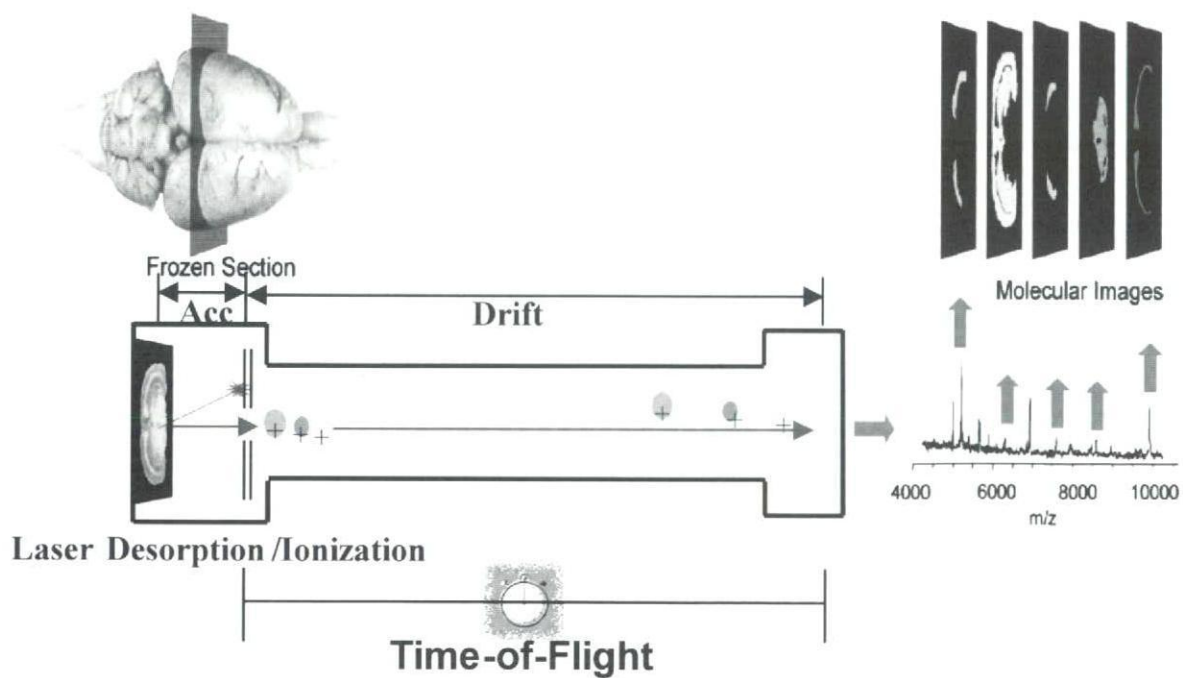


図 3 イメージング質量分析の概念図.



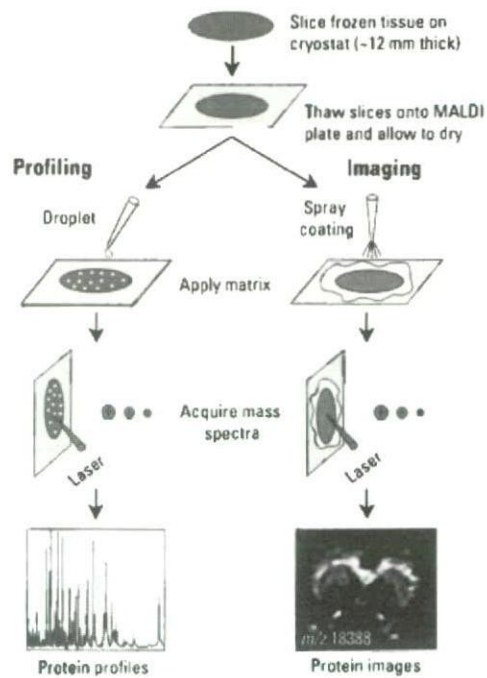


図4 イメージング質量分析の測定モード.

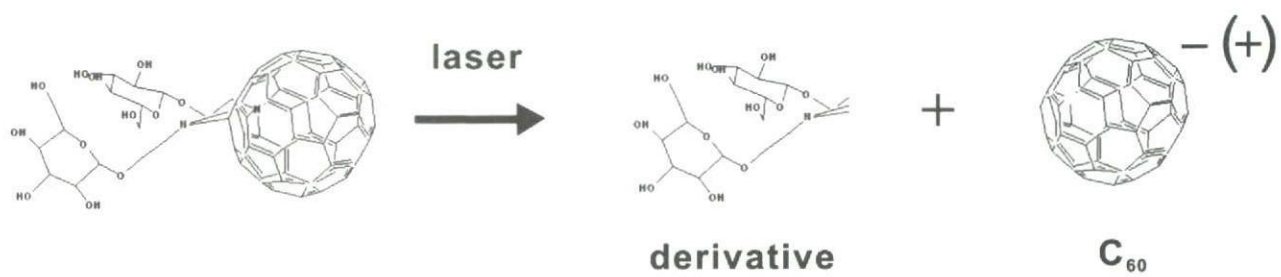


図5 水溶化フラーレンの解離モデル.



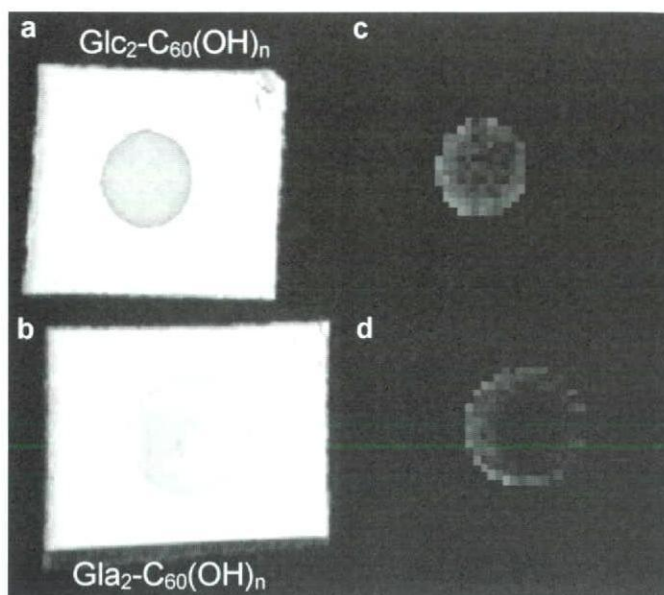


図6 Nitrocellulose membrane 上の糖鎖水溶化フラーレンのイメージング像.

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

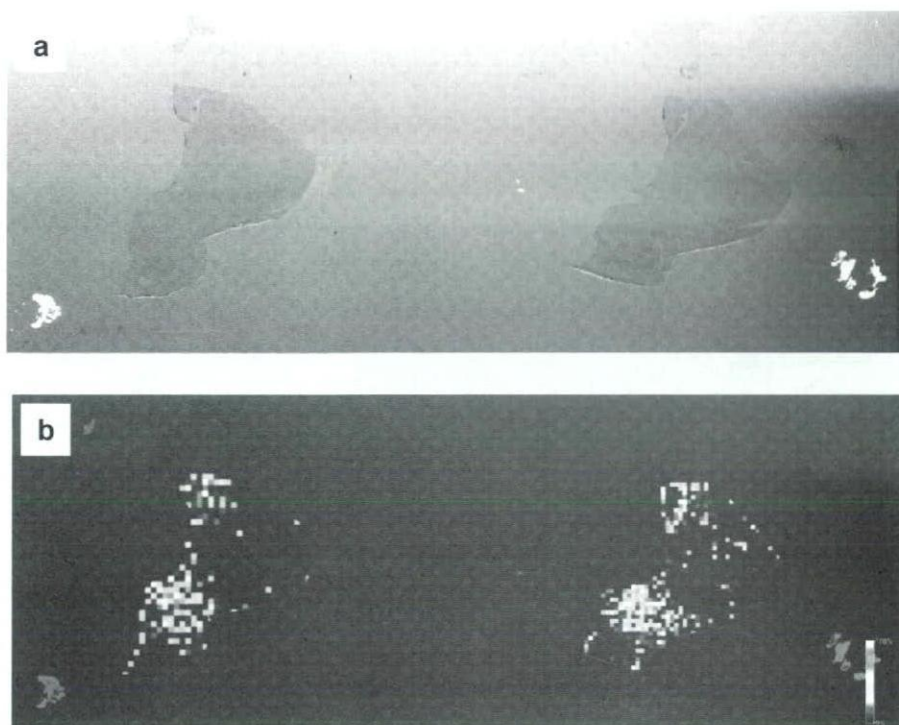


図7 ラット肝臓組織上の水溶化フラーレンのイメージング像.

a) ラット肝臓組織切片. b) 質量 720 で表示したイメージング像.



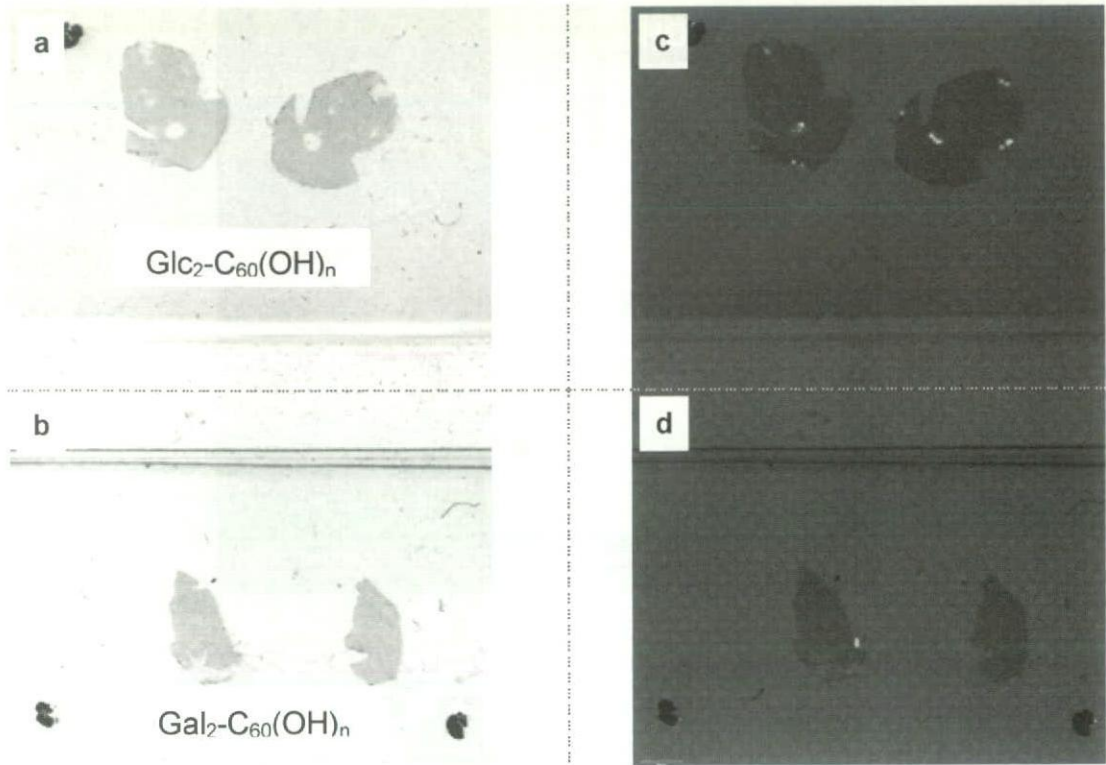


図 8 ラット肝臓組織上の糖鎖水溶化フラーレンのイメージング像.

a)  $\text{Glc-C}_{60}(\text{OH})_n$  を注入したラット肝臓組織切片. b)  $\text{Gal-C}_{60}(\text{OH})_n$  を注入したラット肝臓組織切片. c)  $\text{Glc-C}_{60}(\text{OH})_n$  を注入したラット肝臓組織切片を質量 720 で表示したイメージング像. d)  $\text{Gal-C}_{60}(\text{OH})_n$  を注入したラット肝臓組織切片を質量 720 で表示したイメージング像.

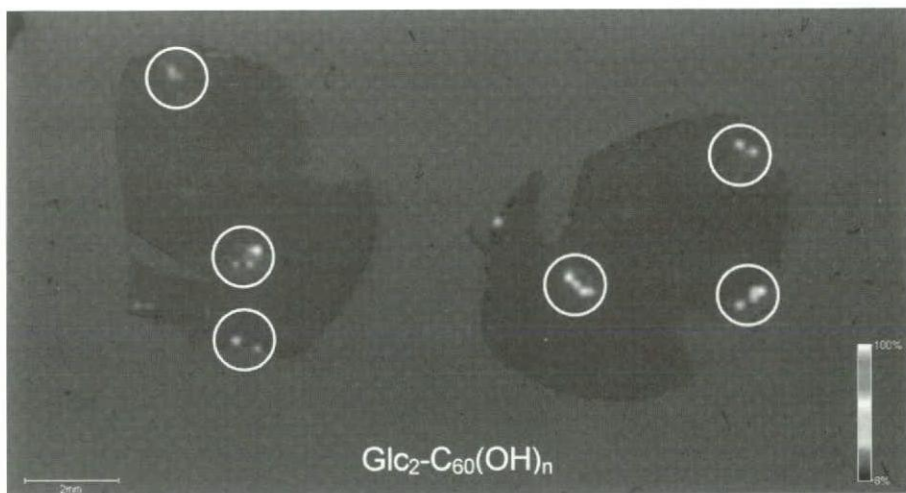


図 9 ラット肝臓組織上の  $\text{Glc-C}_{60}(\text{OH})_n$  水溶化フラーレンの質量 720 で表示したイメージング像.

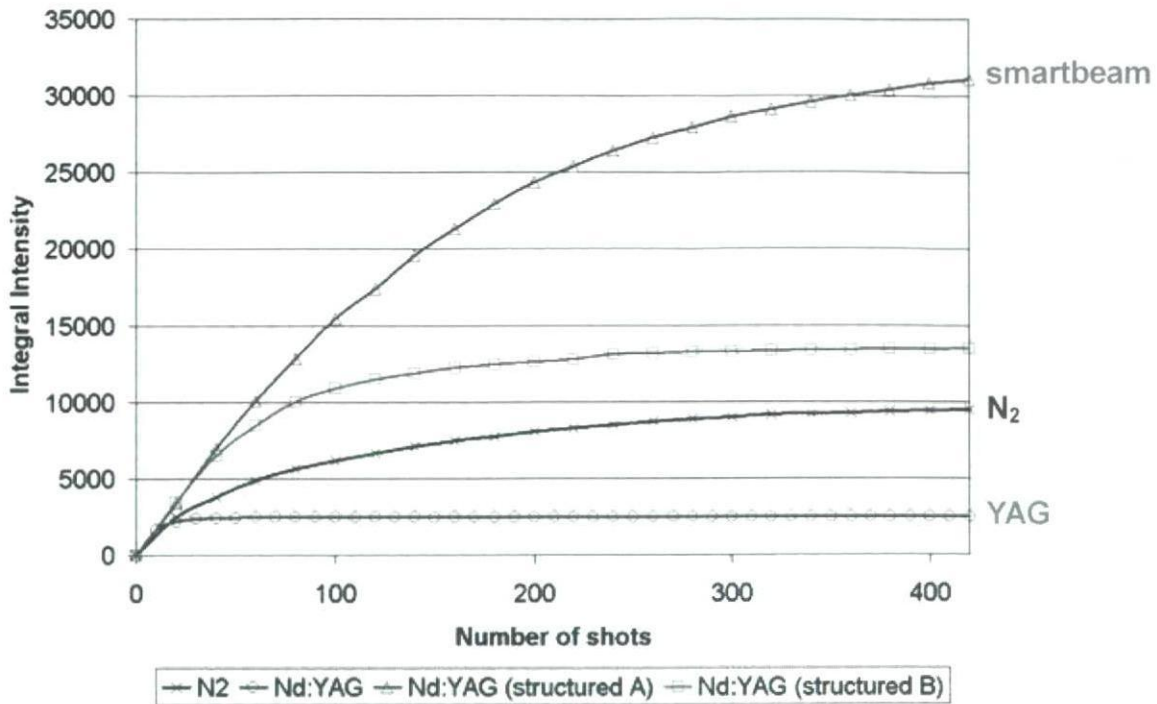
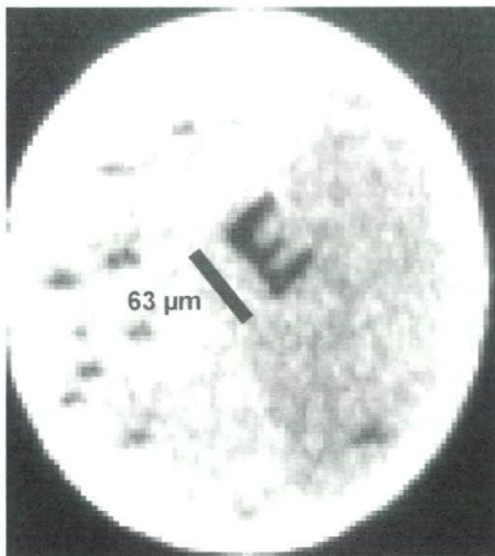
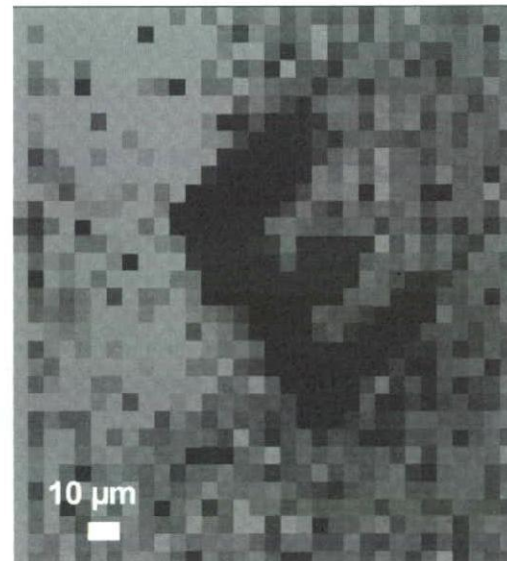


図 10 質量イメージングの 1 スポットから得られる積算ピーク強度.



**Microscopic Image**

63 μm letter burned  
into 400μm PAC calibration spot.



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

SmartBeam  
Laser spot size about 10 μm  
Step size 5 μm

図 11 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 10μm、ターゲットプレート移動ステップ: 最小 5μm.



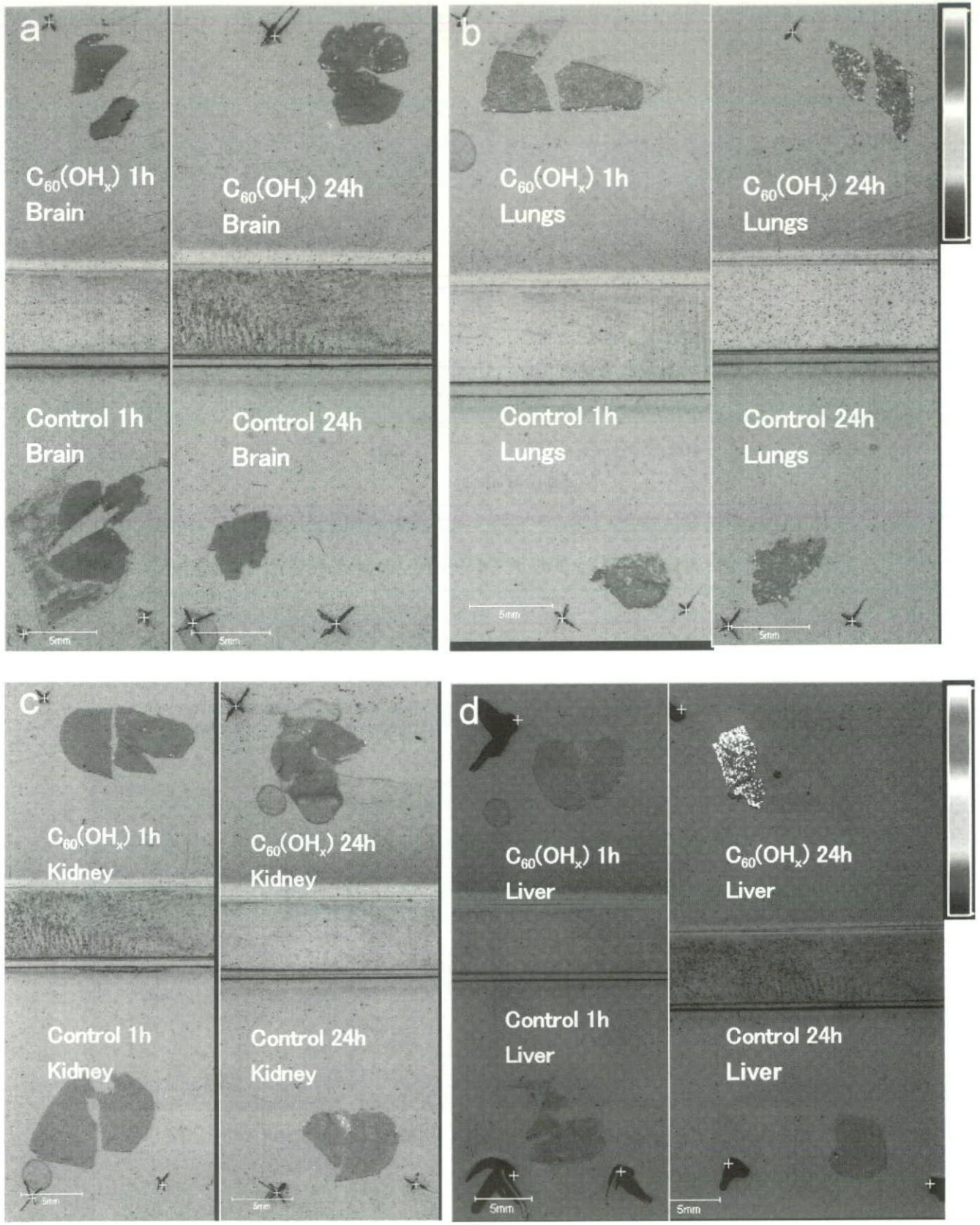


図 12  $C_{60}(OH)_n$ を注したラットの1時間後および24時間後の脳(a)、肺(b)、腎臓(c)、肝臓(d)の切片の質量イメージマッピング。 $C_{60}(OH)_n$ 埋入組織切片(下)、コントロール(上)。

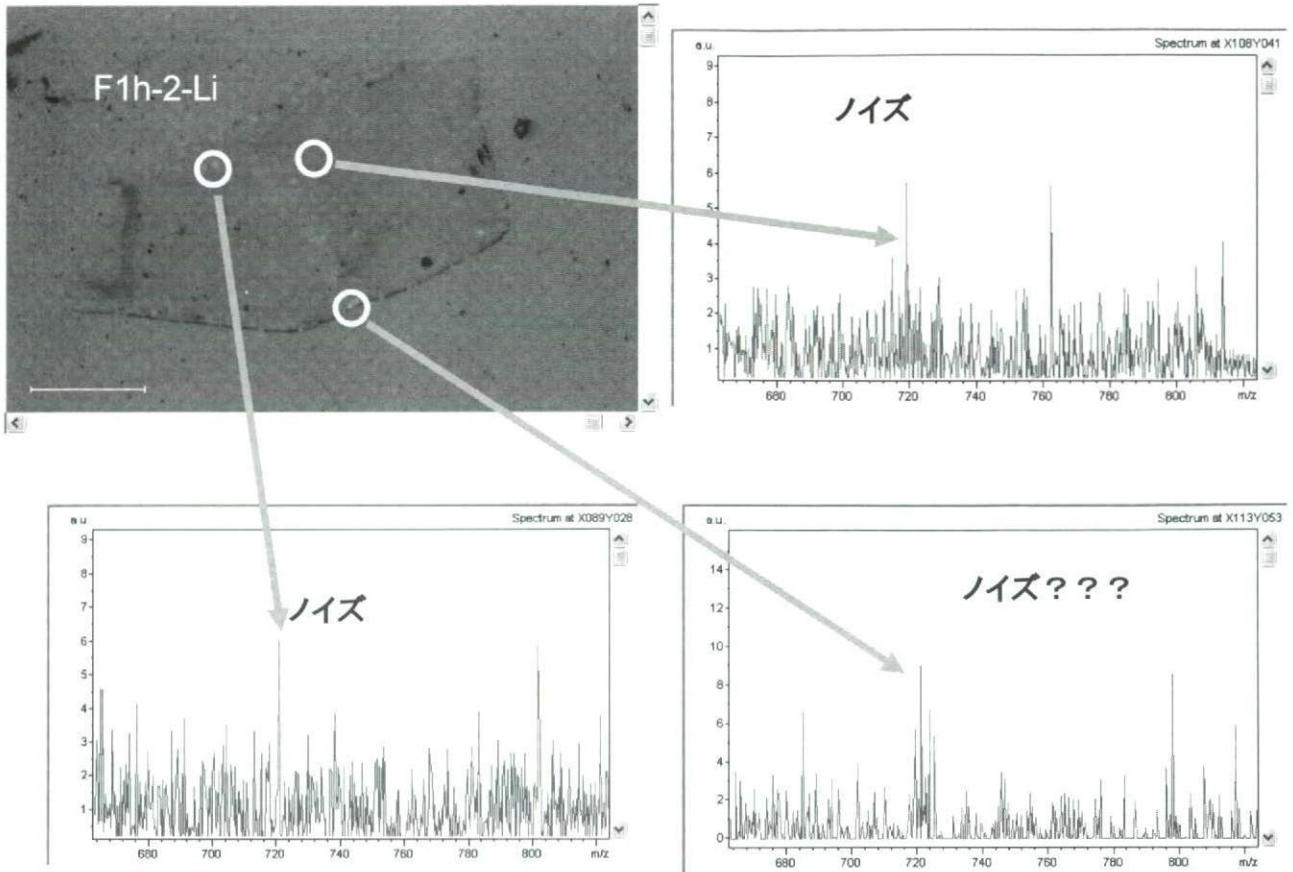


図 13 1 時間後の肝臓切片の質量イメージマッピング。Signal to Noise が低く、 $C_{60}$  (質量数 720 m/z) が存在すると断言できない。

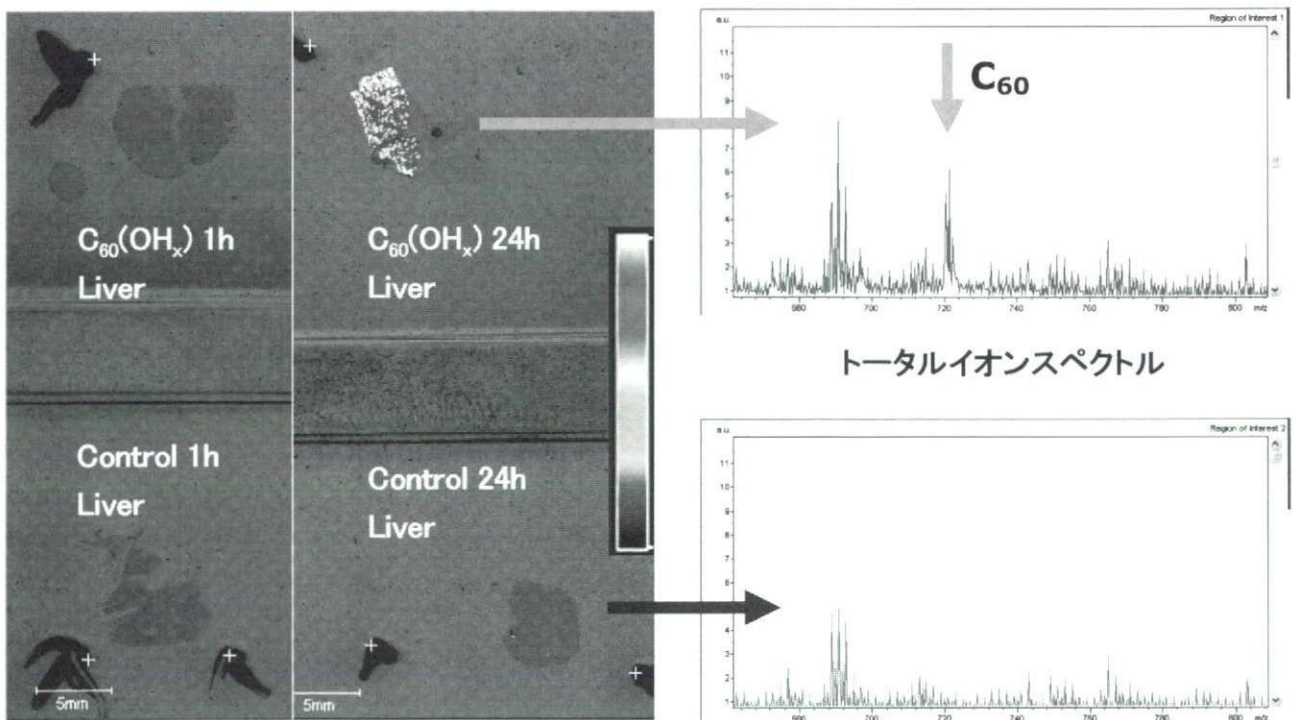


図 14  $C_{60}-(OH)_n$  を注したラットの 24 時間後の肝臓切片の質量イメージマッピングと質量スペクトル。



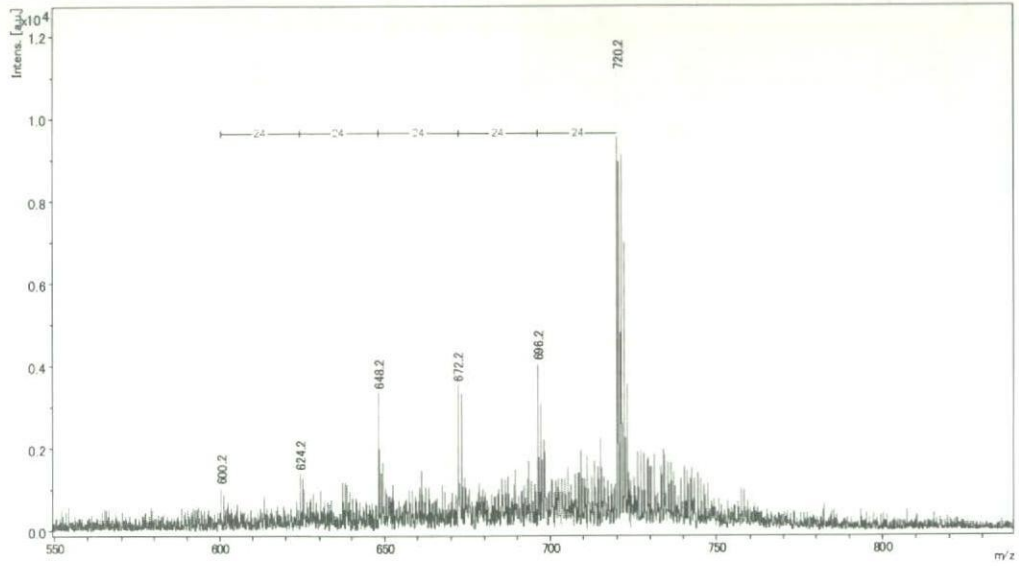


図 15  $C_{60}-(OH)_n$  を注したラットの 24 時間後の肝臓切片の質量スペクトル。C<sub>2</sub> ロスが観測される。

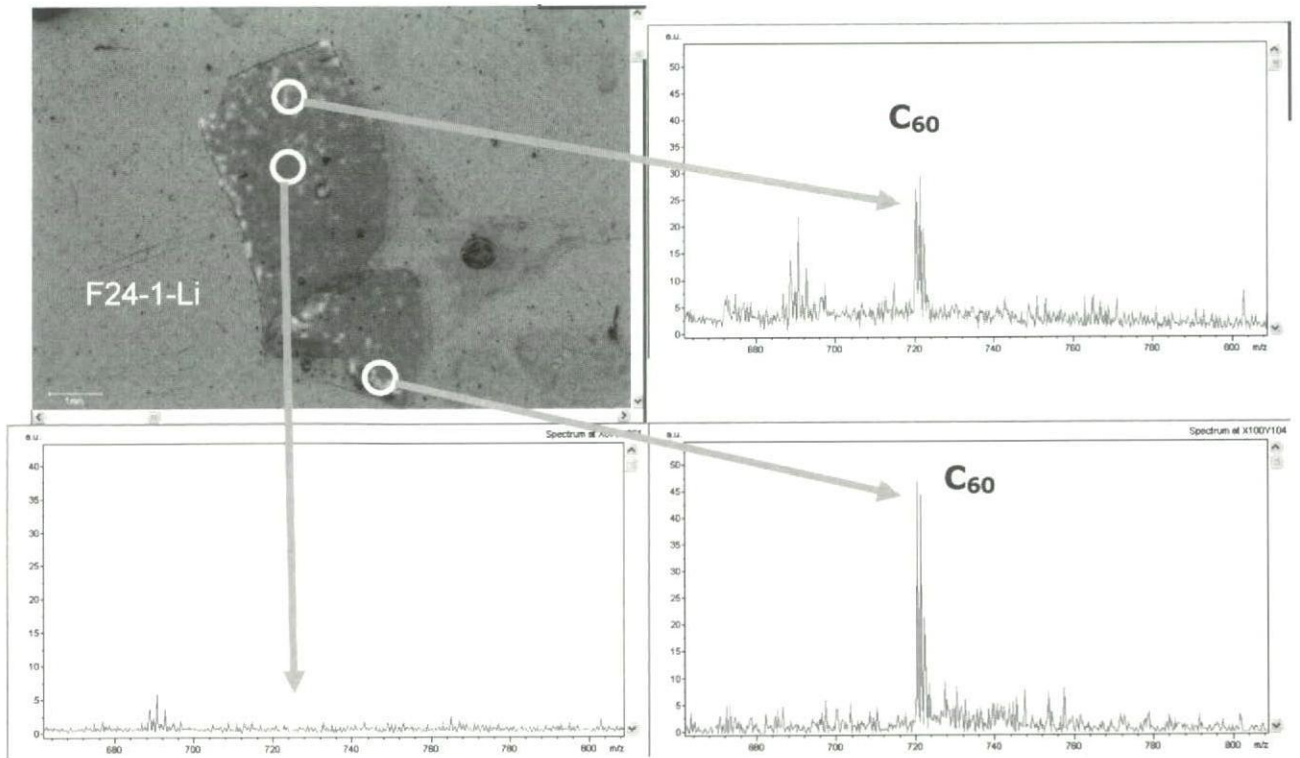


図 16  $C_{60}-(OH)_n$  を注したラットの 24 時間後の肝臓切片の質量イメージマッピングとそのイメージングポイントの質量スペクトル。

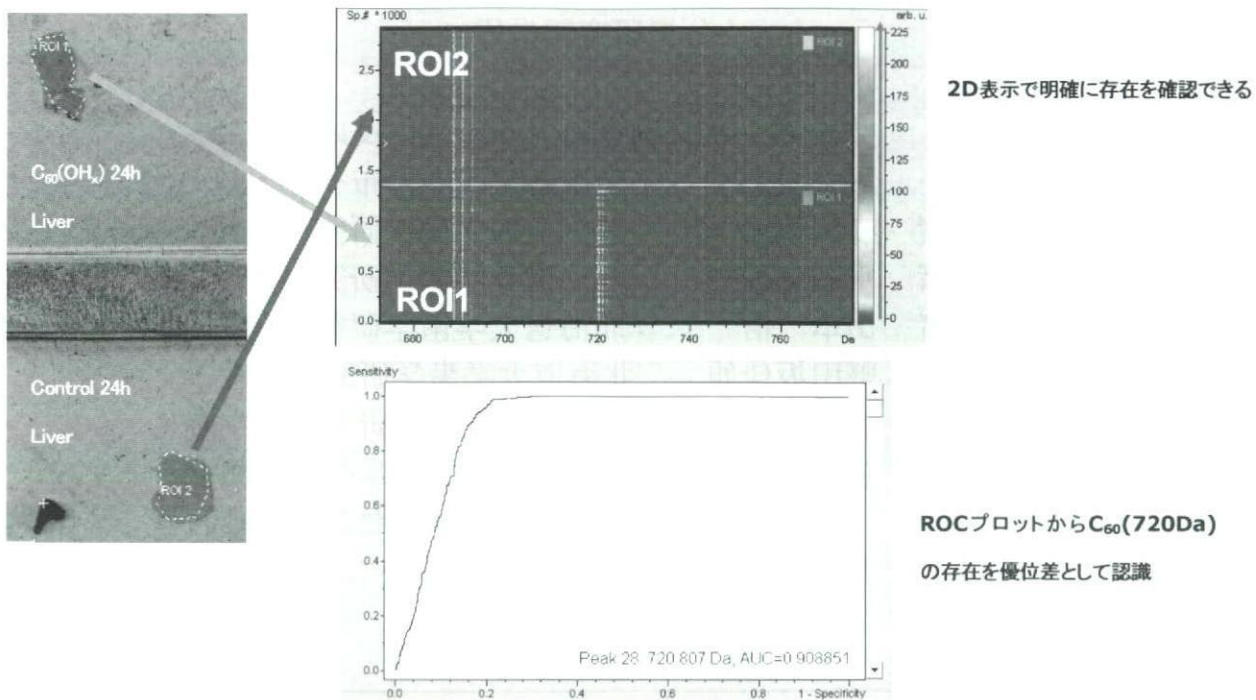


図 17  $C_{60}-(OH)_n$  を注入したラットの 24 時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングにおいて、質量数 720 での受信者動作特性曲線 (ROC 曲線)。

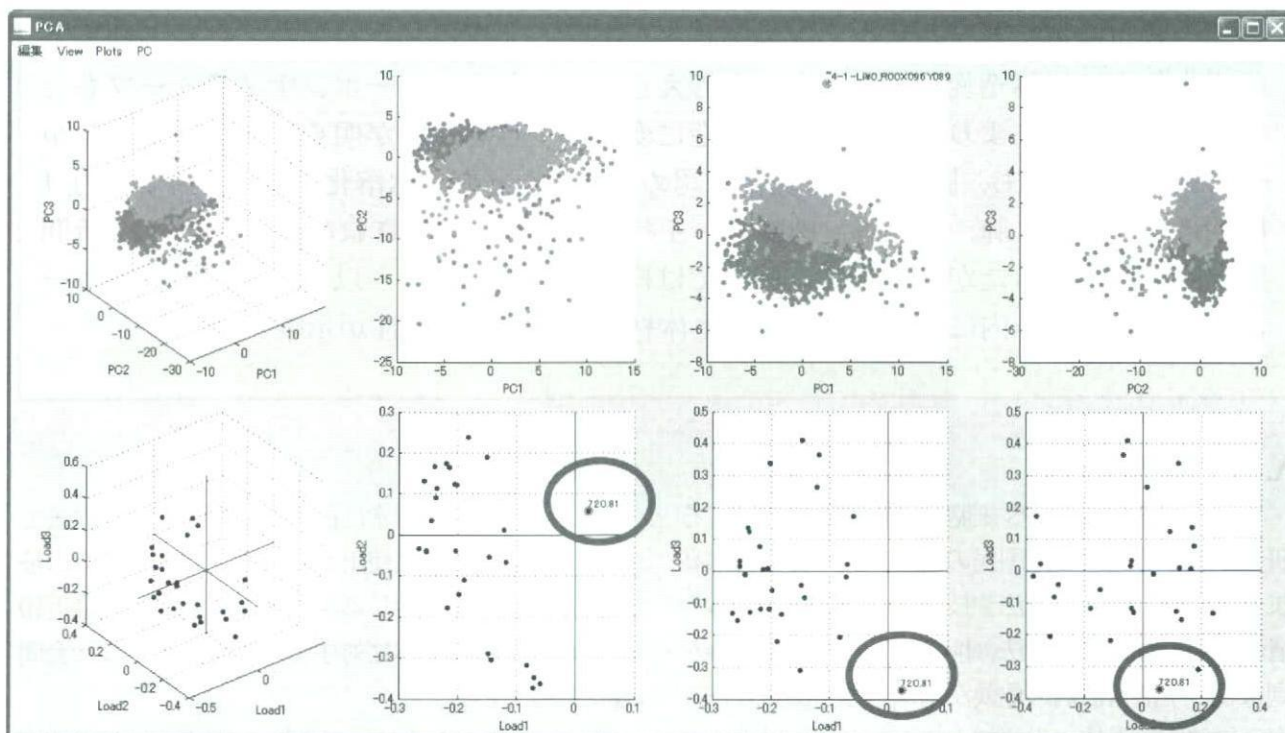


図 18  $C_{60}-(OH)_n$  を注入したラットの 24 時間後の肝臓の切片の投与サンプルとコントロールの主成分解析 (PCA)。ローディングプロット中にある質量数 720 m/z がアウトライアとして現れていることから、 $C_{60}$  が肝臓組織に元々存在しないものであることを示している。