

2007/2049A

様式A-1 (5)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 20年 4月 1日

厚生労働大臣

殿

住 所 〒520-2192 滋賀県大津市大將軍1-17-26

フリカナ モリタ マサヒト

研究者 氏 名 森 田 将 史 印

(所属機関 大阪大学)

平成 19年度厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 光・磁場応答性ナノ分子プローブの開発とその医療用生体分子イメージング手法への応用 (H19-ナノ-若手-005)

国庫補助金精算所要額 : 金 5,000,000 円也 (うち間接経費 0 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
(総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入すること。)
7. 健康危険情報
 - ・研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報 (国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものがある場合や、研究過程において健康危険情報を把握した場合には、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる内容と理由を簡潔に記入するとともに、その情報源 (研究成果、研究者名、学会発表名、雑誌等の詳細) について記述すること。
 - ・既に厚生労働省に通報した健康危険情報であっても、本研究報告書の提出の時点において健康危険情報に該当すると判断されるものについては記述すること。
 - ・分担研究者、研究協力者の把握した情報・意見等についても主任研究者がとりまとめ、一括して総括研究報告書に記入すること。
 - ・なお、交付基準額等決定通知の添付文書において、健康危険情報を把握した際には、一定の書式で速やかに厚生労働省健康危機管理官まで通報していただくよう協力をお願いしているので、本件とともに留意すること。

別添 1

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

別添 2

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

別添 3

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

別添 4

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

光・磁場応答性ナノ分子プローブの開発と
その医療用生体分子イメージング手法への応用

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 森田将史

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
光・磁場応答性ナノ分子プローブの開発とその医療用生体分子 イメージング手法への応用	_____	1
森田将史		
II. 分担研究報告		
1. 磁性ナノダイヤモンドの創製と マルチモジュールイメージングデバイスの開発	_____	5
犬伏俊郎		
2. 有機化学的アプローチによるナノダイヤモンド表面修飾方法の開発	_____	8
小松直樹		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	_____	12

光・磁場応答性ナノ分子プローブの開発とその医療用生体分子イメージング手法への応用

主任研究者 森田将史 大阪大学免疫学フロンティア研究センター

研究要旨

再生医療や細胞治療において、移植細胞のトラッキングの評価を長期間にわたり、低侵襲的に行うには、移植細胞の生理機能を阻害することなく、細胞を検出することが必要である。本プロジェクトでは、上記目標を達成するための基盤技術として、ナノ炭素化合物の一種である、ナノダイヤモンド(ND)を、MRIや蛍光により検出可能な細胞内長期安定性プローブとして開発すること、および光・磁場応答性NDナノ分子プローブを、MRIと蛍光で同時に検出することを可能にするMRI・蛍光同時検出デバイスを開発し、将来的に臨床用のMRI装置に組み込みことを目指す。

本年度は、ナノ分子プローブ開発に関しては、ND内部へ効率的にマングネシウム注入を行う手法を確立することにより、 T_2 短縮効果を持たせることに成功した。マウスリンパ節の可視化を蛍光で行うことができた。

分担研究者

犬伏俊郎 滋賀医科大学MR医学総合研究センター 教授

小松直樹 滋賀医科大学生命科学講座 准教授

A. 研究目的

高齢者の医療費削減が急務な今日、多様な情報の取得による画像診断技術の進歩や診断精度向上とともに、予防医学の進展が求められている。本研究プロジェクトでは、とくに再生医療や細胞治療での低侵襲な細胞機能の検出手法するためのナノ分子プローブを合成し、一度に多様な情報を取得でき、さらに低侵襲かつ感度のよい蛍光画像とMRIを同時に取得するデバイスを開発する。

こうした目的のため、いままでに超常磁性鉄微粒子を導入したミクログリアや神経幹細胞の動態をマウス、ラット脳内で検出してきた。しかしながら、臨床機として普及し始めた3T以上の高磁場では、非常に強い T_2 短縮効果により、gradient-echo法による高速画像取得が難しく、また大量の鉄分子の T_2 ブロードニング効果により、細胞トラッキングはできても、生体

機能の指標となる化合物のMR信号の線幅が広がってしまい、メタボミクス解析ができなくなってしまうなど、問題点もあった。

そこで、本研究では生体適合性の高いと期待される炭素原子からなるナノダイヤモンド(ND)の表面修飾、および常磁性イオン注入による内部改変により、上記問題点を解決する光・磁場応答性分子プローブを創製する。常磁性イオンをNDの内部にイオン注入することで毒性を回避しつつ、MRI用造影剤としてのMR画像が取得できる。またイオン注入時に形成される欠陥に由来するカラーセンターからの蛍光により細胞形態も可視化できる。これらの技術が開発できれば、細胞治療において、短時間に多様な情報を取得でき、高齢者でも負担の少ない患者さんにやさしい予防医学的画像診断法の確立につながり、健康寿命を延ばす結果をもたらすと期待される。

一方、MRIと蛍光を同時に取得することは、予防医学的見地からも重要で、経時的な画像データによる観察から、疾患になりやすい部位の予測が可能になり、効率的な投薬が可能になる。また、病態解析時、とくに癌においては、癌細胞の転移状態と浸潤具合を一度に検査することが可能になると期待される。

B. 研究方法

1. 試料調整

爆発法で作成されたナノダイヤモンド (ND) (ナノ炭素研究所) をシリコン基盤上に塗布した後、100keVのMn⁺を1x10¹⁶/cm²打ち込んだ。その後、水素化、塩素化、アミノ化処理を順次施したND表面のアミノ基にAlexa Fluor 680-NHS (Invitrogen)を反応させ、蛍光色素付与を行った。合成された近赤外蛍光付与磁性NDの物性は、X-band ESR (JES-TE300, JEOL)、FT-IR (IRPrestige-21, Shimadzu)、分光光度計 (Ultrospec 6300 pro, GEヘルスケア バイオサイエンス)、SEM (JSM-7500F, JEOL)により、それぞれ調べた。

2. MRI測定

イオン注入したNDは、1%または0.5%アガロースゲルに包埋した。T₁、T₂強調画像 (T₁WI,) およびT₁値の撮像には、Varian社製40cm口径7テスラMRI装置 (INOVA) を使用した。RFコイルは、Varian社製バードケージコイルおよび自作表面コイルを用いた。T₁およびT₂強調画像 (T₁WI, T₂WI) は、spin echo法による撮像した (T₁WI: TR = 250 or 300ms, TE = 20 or 30 ms, FOV = 40 x 40 mm², matrix = 512 x 256; T₂WI: TR = 3 s, TE = 100 ms, FOV = 60 x 60 mm², matrix = 256 x128)。T₁値およびT₂値測定は、spin-echo法 (T₁; TR = 10000 ms, TE = 30ms, inversion time (TI) = 0.05~2.3 s (0.15s間隔), T₂; TR = 10000 ms, TE = 12~192ms (12ms間隔))での位相エンコードを行わないプロジェクションデータを用いて、以下の式にフィッティングさせて求めた。

$$T_1 \text{値測定: } Mt = M_0 (1 - 2 \exp(-TI/T_1))$$

$$T_2 \text{値測定: } Mt = M_0 (2 - \exp(-TE/T_2))$$

Mt: 各TIおよびTEでの実測値

M₀1&M₀2: 初期値

3. リンパ節可視化実験

蛍光色素付加磁性NDをDMSO中に分散させた後、DMSOに溶かしたDSPE-PEG2000 (日本油脂) と混ぜた。その後、混合液を透析膜に

入れ、蒸留水を入れたビーカー中で攪拌し、ミセルを作成した。この磁性ND入りミセルの、マウスリンパ系への取り込み過程を観察するため、100μlのミセルを足背部皮下に投与した。投与後は、マクロ蛍光顕微鏡システム (Light tools社) に冷却CCDカメラ (ORCA-ERII; Hamamatsu) を装着して、フオーレン麻酔下において観察した。

(倫理面への配慮)

当該研究に関して、すべての動物実験については、滋賀医科大学動物実験委員会による審査・承認を受けており、当該委員会の指針に従い、動物に苦痛を与えないよう実験を行った。

C. 研究結果

1. NDのT₁短縮効果について

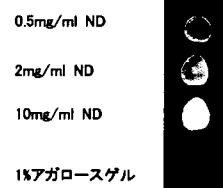


図1. 0.5%アガロースゲル、2mg/mlのマンガンイオン注入したND を含んだ0.5%アガロースゲル、および2mg/mlのNDを含んだ0.5%アガロースゲルでのT₁強調画像の比較

NDそのもののT₁短縮能を評価したところ、ND自体でも10mg/ml程度の濃度であれば十分なT₁短縮効果を持つことが分かったが、分子・細胞イメージングでの利用を考えた場合、より低濃度で造影機能を持たせる必要があらうと考えられ、常磁性イオン注入を行い、磁性強化を図ることを目指した。

2. NDの内部改変および表面修飾による蛍光・磁性ナノダイヤモンドの合成

Mnイオン注入によるMn-ND合成、および表面アミノ基付加までの合成スキームは、図1 (a)のような工程で行った。合成されたMn-ND内部のMn電子状態を確認するため、ESR測定を行ったところ、イオン注入前のNDでは、3価によるFeイオンおよびダングリングボンドに由来するラジカル信号が見られたのに対し、イオン注入したNDでは、それ以外にMn²⁺による信号が見られた (図1 (b))。

さらに、表面修飾後の表面状態をFT-IRにより調べたところ、表面修飾後にはアミノ基の伸縮振動(～3500 cm⁻¹)に由来する信号が見られ、アミノ基が十分量、Mn-ND上にあることが確認できた。このアミノ基を介してAF-680が導入できたことは、吸収スペクトルから確認できた(図1(d))。

また、イオン注入法は、物理的ないND中をMnイオンが通過するため、NDへのダメージも大きいと予想され、破壊されてしまう恐れがあったが、SEM画像から、Mnイオン注入したサンプルでも約4nmの大きさの粒子が観察できたことから、そのようなことはないことが確認できた(図1(e))。

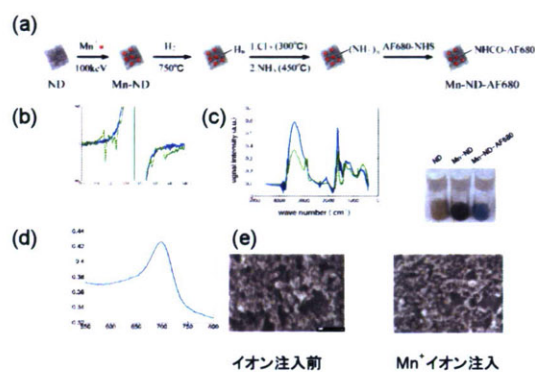


図2. (a) マンガンイオン注入法による磁性ナノダイヤモンド(Mn-ND)の創製とアミノ化表面修飾による蛍光色素(AF680)の合成方法とその合成後の写真 (b) ESRによる注入イオンの確認 (c) 表面修飾前後のIRスペクトラム (d) 蛍光色素付加後の吸収スペクトル (e) イオン注入前後のSEM画像

3. Mn+イオン注入NDの造影能

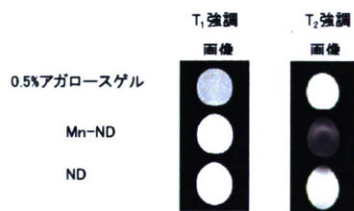


図3. 0.5%アガロースゲル、2mg/mlのマンガンイオン注入したNDを含んだ0.5%アガロースゲル、および2mg/mlのNDを含んだ0.5%アガロースゲルでのT₁強調画像、およびT₂強調画像の比較

合成したMn-NDのMRIへの効果を調べるため、7T MRI装置におけるT₁およびT₂強調画像で比較したところ、Mn⁺イオン注入したNDを含んだサンプルでのT₂のコントラストが大きいことが分かった。T₂短縮能を持つ濃度は、2mg/mlとイオン注入しない場合のT₁短縮効果を持たせる場合に比

べ、より低いことが分かった。

4. リンパ節可視化のための造影剤への応用

ミセルに包接した蛍光色素(AF680)付加したNDをマウス足背部皮下に投与した後、30分後には、リンパ管および鼠径リンパ節辺縁部のリンパ系に取り込まれていることを、マクロ近赤外蛍光顕微鏡で確認できた。

D. 考察

長期間にわたるナノ粒子による細胞トラッキングのためには、細胞内で、粒子が凝集せず、安定に存在し、細胞本来の生理的機能を阻害しないことが必要である。今回使用したNDは、直径約4nmで、ほぼ炭素原子のみからなるため生体適合性が高いと期待でき、イオン注入法を用いることで、単一粒子での磁性・蛍光特性保持が可能で、さらに高い剛性により、常磁性イオン、カラーセンターの安定化が可能となうえ、有機化学的手法による表面修飾による生体特異性を付与することが可能であるという利点を持つため、長期間細胞内安定化を図るには、よい候補であると期待できる。今年度は、このNDに、常磁性イオンであるMnイオンをイオン注入することで、MRIの造影剤として機能させることに成功した。イオン注入法は、1価のMnイオンを高速にNDに物理的に衝突させることで、ND内部に入り込み、そのエネルギーを回りに発散しながら、最終的にND内部で停止する。通常、この状態では、注入したイオンは、0価になっていると考えられるが、今回、NDでのMnイオンが2価になっていることをESRで確認し、その常磁性効果は、MRIのT₂短縮能となって現れた。このことは、NDの炭素が、うまくMn²⁺を配位している可能性を示唆しており、その構造的な要因を探ることで、今後のよりよい造影剤開発につながっていくと考えられる。

E. 結論

爆発法による生成されたNDは、それ自体でT₁短縮効果を持つことが分かったが、さらに磁性強化のため、イオン注入法により、常磁性イオンであるマンガンイオンをNDに

注入することを試みたところ、より低濃度でT₂短縮効果を持たせることに成功した。この結果から、常磁性イオンのイオン注入法による新規造影剤の開発方法が有効である可能性が示された。さらに表面修飾により、蛍光色素を付加もでき、光・磁場応答性マルチモーダルナノプローブとしても可能であることが分かった。

今後は、より低濃度で効果を持つよう、イオン注入法そのものの再検討、およびイオン注入後のダメージからの回復状態を最適化することを行っていく予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tsuchiya D, Chishiro S, Saeki M, Tachiguchi T, Shimohama S and Tooyama I. Microglial transplantation increases the Amyloid-β clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett.* 581: 475-478 (2007)

2. 学会発表

- ・ 森田将史、佐々木玄、長町信治、瀧本竜哉、小松直樹、森川茂広、犬伏俊郎
磁性ナノダイヤモンドの創製と分子・細胞イメージングへの応用
第2回日本分子イメージング学会（福井）2007年6月28日
- ・ 小松直樹、森田将史、瀧本竜哉、木村隆英、犬伏俊郎、“磁気、および光応答性ナノダイヤモンド”ポスター発表、第33回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、2007年7月13日、福岡
- ・ 森田将史、佐々木玄、長町信治、瀧本竜哉、小松直樹、森川茂広、犬伏俊郎
イオン注入法によるナノダイヤモンドのMRI造影剤への利用
第35回日本磁気共鳴医学大会（神戸）
2007年9月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

磁性ナノダイヤモンドの創製とマルチモダールイメージングデバイスの開発

分担研究者 犬伏俊郎 滋賀医科大学MR医学総合研究センター

研究要旨

再生医療や細胞治療において、移植細胞のトラッキングの評価を長期間にわたり、低侵襲的に行うには、移植細胞の生理機能を阻害することなく安定に検出能を維持させることが必要である。本研究では、光・磁場応答性NDナノ分子プローブとしてNDに磁性・蛍光を付与し、そのプローブを用いた移植細胞を、MRIと蛍光で同時に検出することを可能にするMRI・蛍光同時検出デバイスを開発し、将来的に臨床用のMRI装置に組み込みことを目指す。

本年度は、分子プローブ開発では、イオン注入に適したNDとして、爆発法NDが適していることを明らかにした。また、デバイス開発では、動物特異的なRFコイルを作成するために必要な非磁性素材でできた可変キャパシタやチップキャパシタの選定を行うとともに、実際に中型のサルまで対応可能なRFコイルの作成を行った。今後、光伝送・検出用のバンドルファイバーが組み込むことを想定して、銅薄および電気回路は、円筒状の亚克力素材のものの上に構築した。

A. 研究目的

再生医療や細胞治療において、移植細胞のトラッキングの評価を非侵襲的に、効率よく行うには、検出感度の高いNDナノ分子プローブを用いて、対象となる動物に応じたデバイス作成を行うことが必要になる。さらに、今回、開発を目指しているMRI・蛍光同時撮像のためには、市販の検出装置はないため、MRI装置内で使用可能な非磁性の材質を用いたデバイスを自作する必要がある。そこで、MRIで検出感度を高めることのできるNDの種類決定と、MRIでの性能を低下させることなく、光の伝送、および検出を行う装置を組み込むようなデバイス作成を行うことを試みた。

B. 研究方法

1. 試料調整

高温高压法で合成されたナノダイヤモンド(ND) (トーメイダイヤ) と爆発法で作成されたND (ナノ炭素研究所) を、それぞれシリコン基盤上に塗布した後、100keVのMn⁺を1 x 10¹⁶/cm²打ち

込んだ。合成された磁性NDの物性は、X-band ESR (JES-TE300, JEOL)により、調べた。

2. MRI測定

イオン注入したNDは、1%または0.5%アガロースゲルに包埋した。T₁、T₂強調画像(T₁WI,)およびT₁値の撮像には、Varian社製40cm口径7テスラMRI装置(INOVA)を使用した。RFコイルは、Varian社製バードケージコイルおよび自作表面コイルを用いた。T₁およびT₂強調画像(T₁WI, T₂WI)は、spin echo法による撮像した(T₁WI: TR = 250 or 300ms, TE = 20 or 30 ms, FOV = 40 x 40 mm², matrix = 512 x 256; T₂WI: TR = 3 s, TE = 100 ms, FOV = 60 x 60 mm², matrix = 256 x 128)。T₁値およびT₂値測定は、spin-echo法(T₁; TR = 10000 ms, TE = 30ms, inversion time (TI) = 0.05~2.3 s (0.15s間隔), T₂; TR = 10000 ms, TE = 12~192ms (12ms間隔))での位相エンコードを行わないプロジェクションデータを用いて、以下の式にフィッティングさせて求めた。

T_1 値測定: $M_t = M_0(1 - 2\exp(-TI/T_1))$

T_2 値測定: $M_t = M_0(2^{-TE/T_2})$

M_t : 各TIおよびTEでの実測値

M_0 1& M_0 2: 初期値

3. RFコイル作成

RFコイル用に非磁性可変キャパシタ (Voltronics)、および非磁性高電圧対応チップキャパシタ (American Technical Ceramics) を用いた。Hの周波数で共鳴可能であることは、ネットワークアナライザーで確認した。

(倫理面への配慮)

本分担研究では、動物実験は行わなかった。

C. 研究結果

1. NDの大きさの違いによるMRIパラメータに与える影響について

合成方法の違いによるNDの大きさの違いとMnイオン注入の効果の関係を調べた。各ND5mgを1%アガロースゲルに包埋し、 T_1 、 T_2 測定および T_1 、 T_2 強調画像を取得した。その結果、ND4およびND30でMnイオンのよる T_2 短縮効果が確認できたが、その効果はND4のほうが大きかった。この結果から、まずは、イオン注入技術を確認するため、ND4に主にイオン注入を行うことにした。

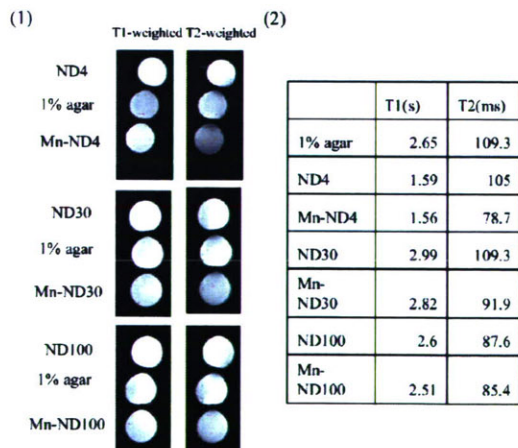


図1. (1) ND4, ND30, ND100のMnイオンを注したND、1%アガロースゲル、原材料のNDの T_1 および T_2 強調画像 (2) ND4, ND30, ND100のMnイオンを注したND、1%アガロースゲル、原材料のNDの T_1 および T_2 値

2. 蛍光取得用デバイス装着可能な動物特異的RFコイルの作成とその信号検出の効率化について

今後、移植した細胞の効率的なMRI画像取得には、さまざまな動物の大きさに特異的なRFコイルを設計する必要がある。今年度は、われわれのMRI装置で取得可能な動物のうち、最も大きなサルの脳を対象とした場合のRFコイルを作成し、今後、マウス、ラットなどの動物にも対応可能な回路設計を確立することを目指した。

現在Varian社から購入した半径19センチのバードケージ型RFコイルを使用している。しかしながら、サルの脳に適した形状と大きさのRFコイルを用いれば、より感度が上昇するのではないかと考え、表面コイルを2つ組み合わせた脳全体を覆う直径10センチの形状のRFコイルを自作した(図2(1))。その結果、Varian社のコイルと比較して格段のcontrastの上昇が見られた(図2(2))。このことは、少数の細胞集団のMRIでの可視化により適したコイルが作成できることを意味し、今後、さらなる改良を行い、高解像度化を計る予定である。

(1)自作したRFコイル



(2)Varian社コイル

今回自作したコイル

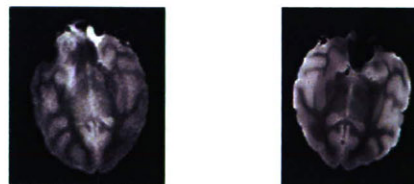


図2. (1)自作RFコイル (2)Varian社と今回自作したRFコイルを用いて撮像したサル抽出脳のspin-echo画像

D. 考察

NDの合成方法の違いによる大きさの違いが、MRIのコントラストに影響を与えることが分かった。このことは、イオン注入塗布効率とイオン注入効率の観点でわけて考えることができる。まず、イオン塗布効率については、高温高压法で合成さ

れたNDの分散性が悪いため、シリコン基盤上への塗布が効率よく行えなかった可能性が考えられた。今後は、超音波による分散性の向上を目指したイオン注入前処理の効率化を図ることが重要であることが示唆された。また、イオン注入効率に関しては、NDの大きさが大きいことは、すなわちNDの中心部へイオンが侵入しにくいことになり、Mnイオンの集積が難しいことにつながる。この問題を解決するには、よりエネルギーの高いイオン注入装置を使用するなどに対応していく必要があるであろう。

E. 結論

高温高压法と爆発法の合成法の違いによるNDの大きさの差が、MRIの効果の違いをもたらすことを明らかにした。

また、デバイス作成では、光ファイバーの装着を可能にする動物コイル特異的RFコイルの作成を行った。

今後は、光伝送・検出用に作成したバンドルファイバーを装着できるユニットを作成し、がん細胞移植モデル系での動作検証を行っていきたい。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 2) Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tsuchiya D, Chishiro S, Saeki M, Tachiguchi T, Shimohama S and Tooyama I. Microglial transplantation increases the Amyloid- β clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett.* 581: 475-478 (2007)

2. 学会発表

- ・森田将史、佐々木玄、長町信治、瀧本竜哉、小松直樹、森川茂広、犬伏俊郎
磁性ナノダイヤモンドの創製と分子・細胞イメージングへの応用
第2回日本分子イメージング学会（福井）2007年6月28日

- ・小松直樹、森田将史、瀧本竜哉、木村隆英、犬伏俊郎、“磁気、および光応答性ナノダイヤモンド”ポスター発表、第33回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、2007年7月13日、福岡

- ・森田将史、佐々木玄、長町信治、瀧本竜哉、小松直樹、森川茂広、犬伏俊郎
イオン注入法によるナノダイヤモンドのMRI造影剤への利用
第35回日本磁気共鳴医学大会（神戸）
2007年9月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

有機化学的アプローチによるナノダイヤモンド表面修飾方法の開発

分担研究者 小松直樹 滋賀医科大学生命科学講座

研究要旨

再生医療における移植細胞のトラッキングの評価や内在性幹細胞の動態を長期間にわたり、同一個体で追跡するためには、細胞内安定に検出能を維持することが必要である。本プロジェクトでは、本年度は、まず上記目標を達成するための基盤技術として、MRIや蛍光により検出可能な細胞内長期安定性プローブを開発することを旨とした。

ナノダイヤモンド(ND)にイオン注入後は、有機化学的な手法をイオン注入NDに適用することで、生体中での分散性の向上や、生体分子認識部位の効率的結合を行えるような基盤技術を確立することを旨とした。

A. 研究目的

再生医療や細胞治療において、移植細胞のトラッキングの評価を非侵襲的に、効率よく行うには、可視化するために必要なNDナノ分子プローブの高感度化と同時に、細胞内での安定性が重要である。ナノ粒子は、その大きさに比べて、表面積が非常に大きくなり、その物性を制御することは、細胞内長期安定化の鍵を握ると考えられる。そこで、本研究では、有機化学的な手法を炭素原子集合体であるNDに応用し、その分散性、および蛍光色素、および生体認識部位付加のための官能基の付与を行うことを旨とした。

B. 研究方法

1. 高温高压法で合成したND表面への修飾反応

原料の酸化的な末端を有するナノダイヤモンド(ND30, 平均粒径30 nm)を水素気流下、750℃で反応させ、一旦、表面をすべて水素化した後、塩素、アンモニアと続けて気相中で反応を行うことにより、アミノ化ナノダイヤモンド(ND30-NH₂)を得た。生成物の表面官能基の変遷は、赤外吸収スペクトル(IR)、元素分析により追跡

し、ダイヤモンド骨格については、ラマンスペクトル、粉末X線回折(XRD)により確認した。

2. ナノ炭素化合物の自在な修飾法の確立

1に示したアミノ化と同様にして、水素化ナノダイヤモンドを原料に、そのアセトキシ化と加水分解によるヒドロキシ化ナノダイヤモンドを合成した。また、長鎖のアルキル基の両端にアミノ基、カルボキシ基を持つ化合物を反応させることにより、ナノダイヤモンド表面からアルキル基を介してアミノ基を導入した。このアミノ基に、FITC-NHS色素を付加させ、蛍光顕微鏡測定により、蛍光を確認した。

3. 異なる官能基を持つNDの分散性評価

各反応基を保持したND30 120mgを水1mlと混ぜ、バス型超音波破碎器で、1時間超音波を照射した。その後、18500gで20分間超遠心分離した後、上澄み上層5mlを回収し、濃縮、乾固および乾燥した後、重量を測定し、回収率を計算した。その結果、水酸化、エステル化、アミノ化いずれも分散度が上昇したが、今後蛍光色素や生体分子付加を目指すことからアミノ化したND30を用いることにした。

(倫理面への配慮)

本分担研究では、動物実験は行わなかった。

C. 研究結果

1. NDの表面修飾による蛍光ナノダイヤモンドの合成

ND4に関しては、塩素化した後、高温でアンモニア気体を反応させ、アミノ化付加を行い、ND表面にアミノ基の付加を行った(図1.(1))。そのアミノ基を介して、FITCを導入すると、蛍光顕微鏡下で、緑色の蛍光を検出することができた(図1.(2))。

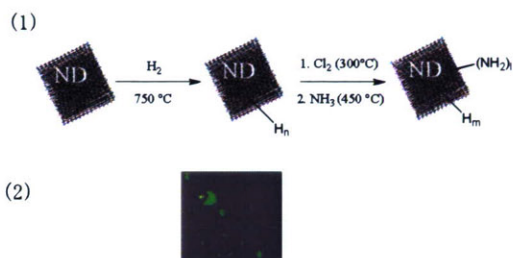


図1. (1)爆発法で作成したND4原材料から、H₂を750℃で反応させ、水酸化した後、塩素、アンモニアを高温で反応させ、アミノ化するまでの過程 (2) (1)アミノ基を介してFITCを付与させたNDの蛍光画像

2. 多様な官能基付加するためのNDの表面修飾手法の確立

ND30の表面修飾により、分散性を高めることを目指した。水酸化、アミノ化、エステル化の表面修飾方法を下記図のように行う手法を確立した(図2)。

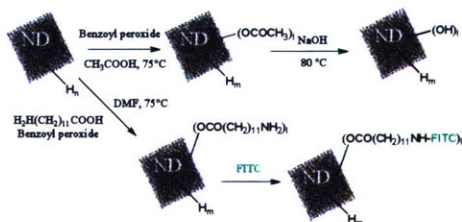


図2. アセトキシル化、ヒドロキシル化ナノダイヤモンドの合成と蛍光部位の付与

4. 多様な官能基付加したNDの分散性について

ND30の表面修飾により、分散性を高めることを目指したが、水酸化、エステル化、アミノ化いずれも分散度が上昇した(図3)。今後蛍光色素や生体分子付加を目指すことからアミノ化したND30を用いることにした。

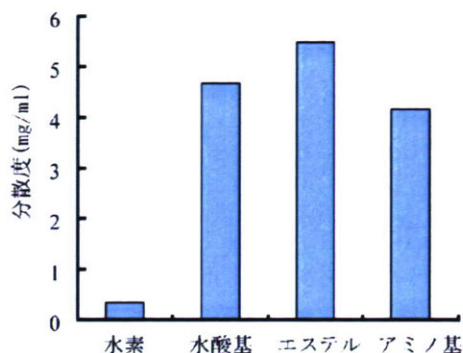


図3. 分散性への表面官能基の影響
原材料の水素化末端、エステル化末端、アミノ化末端の比較した。

D. 考察

NDの表面状態は、当初不均一であったが、今回の用いた手法が、そのような環境化においても、有用であることが示唆された。この手法は、今後、多様な手法で合成されたNDに対しても、応用可能であり、より一般的な反応方法として確立していきたいと考えている。

ただ、より単一粒子での分散性に関しては、まだ改善の余地が残されている。これは、NDの合成方法が通常ナノ粒子とは異なり、非常に高温・高圧下で進むことに由来すると考えられる。今後は、表面修飾時のNDの分散性を維持しながら、より効率的な手法を確立していく必要があると思われる。

しかしながら、今年度、表面修飾方法が確立がある程度確立できたことで、生体応用への可能性が開かれたと言える。

E. 結論

ND上への多様な表面修飾方法を確立した。今後は、この手法を応用して、細胞内で安定により安定に存在できるような高分子の付加等を行っていききたい。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

- ・森田将史、佐々木玄、長町信治、瀧本竜哉、小松直樹、森川茂広、犬伏俊郎
磁性ナノダイヤモンドの創製と分子・細胞イメージングへの応用
第2回日本分子イメージング学会（福井）2007年6月28日
- ・小松直樹、森田将史、瀧本竜哉、木村隆英、犬伏俊郎、“磁気、および光応答性ナノダイヤモンド”ポスター発表、
第33回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、2007年7月13日、福岡
- ・森田将史、佐々木玄、長町信治、瀧本竜哉、小松直樹、森川茂広、犬伏俊郎
イオン注入法によるナノダイヤモンドのMRI造影剤への利用
第35回日本磁気共鳴医学大会（神戸）
2007年9月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
森田将史	マルチモーダル生体分子・細胞イメージングへの応用	磯部徹彦	ナノ蛍光体の開発と応用	シーエムシー出版	東京	2007	262-269

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, Morikawa S, <u>Morita M</u> , <u>Inubushi T</u> , Tsuchiya D, Chishiro S, Saeki M, Tachiguchi T, Shimohama S and Tooyama I.	Microglial transplantation increases the Amyloid- β clearance in Alzheimer model rats.	<i>FEBS Lett.</i>	581	475-478	2007

10 マルチモーダル生体分子・細胞イメージングへの応用

森田将史*

10.1 マルチモーダル生体イメージングとは

ゲノム情報が明らかになりつつある現在、その遺伝子産物の生体内部での時間的、空間的な振舞いを知ることは、発生現象などの基礎研究ばかりでなく、再生医療における治療効果や疾患の状態判断および治療による効果を知るうえでも重要になってきている。近年、プロテオミクス、マイクロアレイなど生体システム全体での分子レベルでの解析から、病態変動の指標となるバイオマーカー分子の探索が行われているが、同定された分子が、実際に生体内のどこで、いつ、どのように働くか、調べて初めてその重要性が、確認できるといえる。

こうした生体レベルでの分子動態を探るには、ヒトにおける医用画像法として現在用いられている X 線 CT, PET, MRI, 光計測などを用いることができると期待される (図 1)。それぞれの画像法では、固有の計測手段を用いて、特徴的な情報を得られるが、いずれも 1 つの計測手段から得られた情報のみでは、限られた情報しか取得できない。このため、最近の臨床現場では、PET での機能情報を、別の機会に撮像した X 線 CT または MRI による解剖学的情報を基に、診断することがよく行われている。しかしながら、こうした手法は、画像診断の正確性や被験者への負担の問題もあることから、いままで同一被験者に対して、別々に行われていた画像取得を同時に行うことのできるマルチモーダル生体イメージング技術が、次世代の医療診断手法として期待されている。一方、小動物を用いた生体イメージング研究に目を向けてみると、病態モデル動

	X線CT	PET	MRI	Optical
計測手段:	X線	陽電子線	ラジオ波	近赤外線
薬物:	—	放射性同位元素	—	蛍光色素
放射線被曝:	有	有	無	無
侵襲性:	低	有	低	低
特徴:	硬い組織	導入薬物	軟部組織	利便性

図 1 画像診断法の比較

* Masahito Morita (独)科学技術振興機構 さきがけ; 滋賀医科大学 MR 医学総合研究センター 特任助教

物の分子、形態動態を調べるため、さまざまな小動物用に開発されたイメージング機器を用いた研究がさかんに行われるようになってきている^{1,2)}。とくに、PETを中心に、MRIや発光など特定分子に対する分子プローブを利用した生体内での分子・細胞動態を可視化する動きがさかんである。しかしながら、ヒトを対象にした医療機器同様、いままでの手法では、単一分子の生体分布情報が得られるのみで、細胞の位置とその生理的状态など多次元情報を同時に取得することが難しい。その結果、より精緻な細胞動態の可視化に関する研究はほとんど行われてこなかった。しかしながら、現在の単一のエネルギー特性を利用したイメージング機器のそれぞれの特徴を組み合わせれば、多次元的な生体情報に関する知見が得られると考えられる。こうした理由から、マルチモーダル生体イメージング装置として、PET/CTが普及し出し、さらには、より被曝の少ないPET/MRIが開発されてくるなど、一度の検査で多次元情報を得ようとする研究が、大学および医療機器メーカーで進められている³⁾。しかしながら、PETで用いられるプローブの放射性同位元素は、長くても数時間程度の短い半減期のため、繰り返し放射性プローブを投与する必要があるような再生医療における移植幹細胞の分化状態の様子など長期間にわたる現象を可視化するには向いていない。そこで、より低侵襲な撮像法であるMRIや光計測を組み合わせた研究開発が行われるようになってきた。

このようなマルチモーダルイメージングの研究を進めるには、3つの方向性が重要であると考えられる。1つ目は、異なるモダリティにตอบสนองするプローブの開発である。これは、それぞれの異なる画像法で目的とする現象を可視化するために必要だからである。2つ目は、そのプローブの信号を同時に検出するマルチモーダル検出器の開発である。マルチモーダルプローブの動態を検出するためには、モダリティに特徴的なエネルギーに応じて、発生する物理現象を検出する装置を組み合わせる必要があるからである。3つ目は、取得した異なるモダリティからのイメージングデータ解析手法の確立である。それぞれの画像法は、プローブや検出器の感度により、時間的・空間的な検出感度限界があるが、異なる画像法では、その限界が異なる。そこで、統計的な検定手法の開発により、異なる画像データからの有用な情報抽出方法が必要となるからである。本稿では、こうした方向性の中で、1つ目のマルチモーダルプローブ、中でも、より低侵襲で画像取得が可能なMRIと光計測で用いられているナノ粒子について概説するとともに、われわれの現在取り組んでいるプローブについても紹介する。

10.2 マルチモーダルプローブの開発—とくに光・磁場応答性について

生体イメージングにおいてマルチモーダル技術を利用する主な利点は、生体内でおきている多様な生理現象に関わる情報を一度に取得できることである。とくに、光と磁場を用いた手法は、ナノレベルの分子レベルの情報から、形態変化などマクロレベルの情報まで取得できるという特

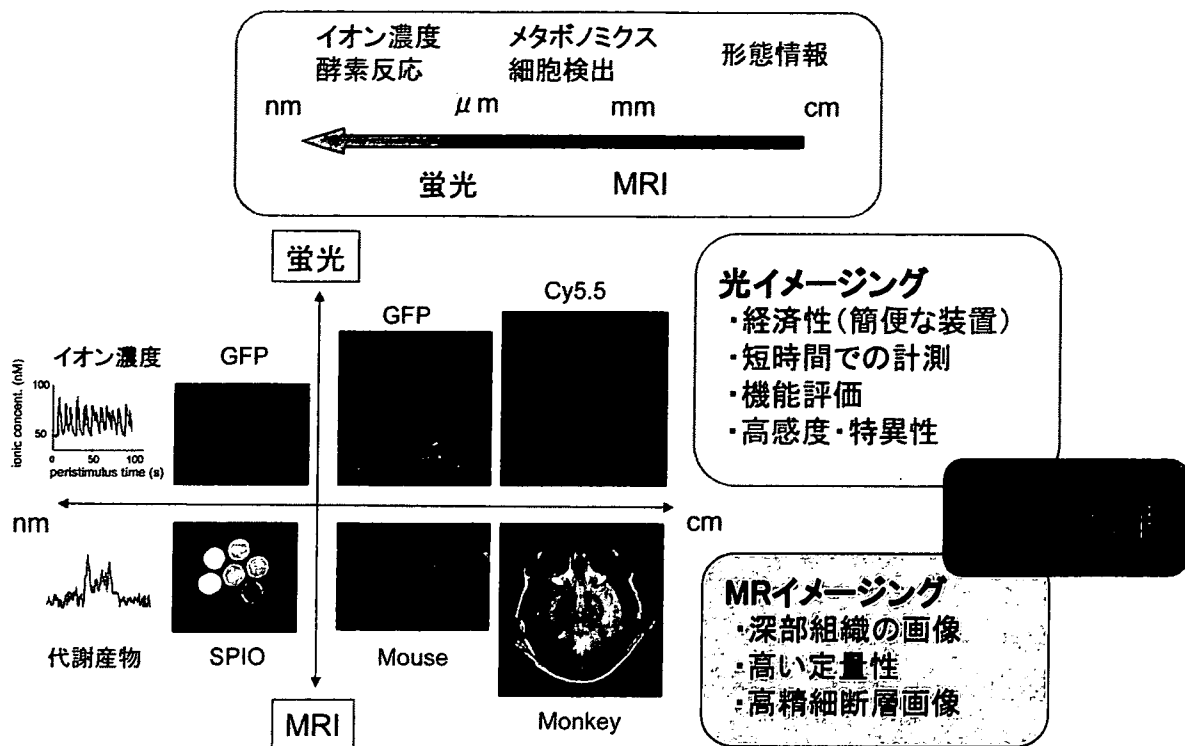


図2 光・MRイメージングを用いた多次元生体情報取得

徴を持つ (図2)。さらに光・MRIともに放射線を使用しないため、低侵襲的であり、同一個体での繰り返し測定に適している手法である。それぞれ、ナノメートルレベルからセンチメートルレベルの階層的なレベルでの現象の可視化に適していると言える (図2)。蛍光イメージングのプロープとしては、低分子有機分子、Qdot⁴⁾、GFP⁵⁾に代表される蛍光たんぱく質、そして有機色素をドーブしたシリカ⁶⁾などが用いられている。蛍光イメージングの特徴として、経済性 (簡便な装置)、短時間での計測、および機能評価や高感度・特異性があげられる。一方、MRIは、深部組織の画像、高い定量性および高精細断層画像の取得などが利点である。したがって、両者を組み合わせた手法は、細胞内のイオン濃度や酵素反応、組織レベルのメタボノミクス、生体内での標的細胞検出、および形態変化など、多様な生理情報を一度に取得することができると期待できる。

ここでは、単一粒子で、同時に光・磁場応答性を持つマルチモーダルプローブに絞り、そのプローブを紹介したい。単一粒子で複数の機能を持たせるためのナノ粒子の形状には、いくつかの方法があるが、基本的には、光応答性部位、磁場応答性部位、および生体適合性部位の主に3つの部分から成り立っている場合が多い。これらの構造として、主に①ヘテロ多量体型と②コア・シェル型を基にしたナノ粒子が報告されている (図3)。①としては、高分子などの分子骨格の周りに、DOTAなどのキレート剤に光・磁場応答性部位を配し、親水性部位や生体認識部位を

ヘテロ多量体型

コア・シェル型

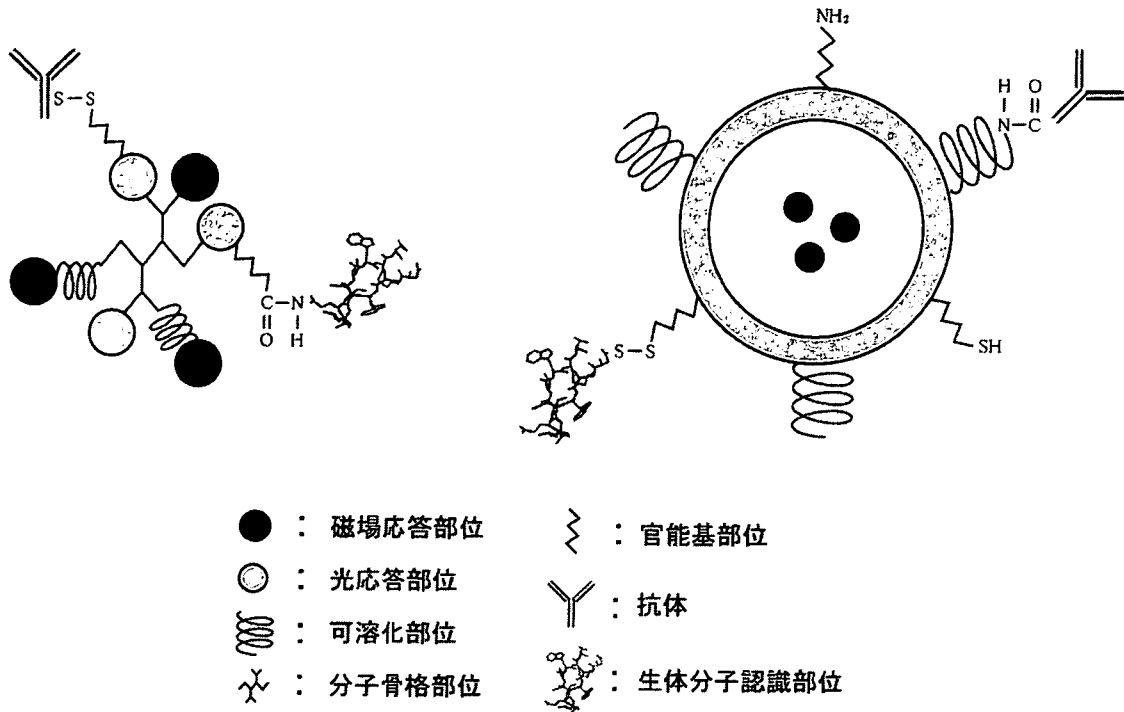


図3 光・磁場応答性マルチモーダル造影剤の構造

分子骨格に付加したタイプである。デンドリマー^{7,8)}、ポリ-L-リジン⁹⁾そしてミセル¹⁰⁾などを用いた例が知られている。②としては、中心部位とその辺縁部位に、光応答性または磁場応答性の物質を、周辺部位に、親水性や生体認識部位などを付加しているタイプである。超常磁性微粒子¹¹⁻¹³⁾、Q-dot¹⁴⁾やシリカ粒子^{15,16)}を用いた例²⁰⁾が多いが、最近では、磁性を強化するために、合成段階で磁性微粒子にさらにマンガンイオンをドーピングなどの材料化学的なアプローチを用いた、より精緻なプローブ開発¹⁷⁾も行われるようになってきている。

では次に、われわれが取り組んでいる①のカテゴリーに属するポリ-L-リジンを利用した研究⁹⁾、および②のカテゴリーに属するナノダイヤモンド (ND) を利用した研究¹⁸⁾を紹介する。①は、ポリ-L-リジンを骨格として、そのアミノ基部分に、MRI 応答性として F 原子を、また蛍光として FITC を用いた光・磁場応答性マルチモーダルプローブである。たとえば骨には、水分がほとんどないため、プロトンによる MRI での生理状態評価は難しい。そのため、骨芽幹細胞のような将来骨になる細胞の分化状態を経時的に低侵襲的に追跡するには、水分子の H 核によらない造影剤の開発が必要である。また、アルツハイマープラークの除去を目的としてマイクログリアと呼ばれる細胞を利用できるか検証する研究では、静脈から投与した後、どの程度の細胞が目的の部位に到達したのかを調べる必要がある。MRI 用の造影剤だけでは、限局した撮像領

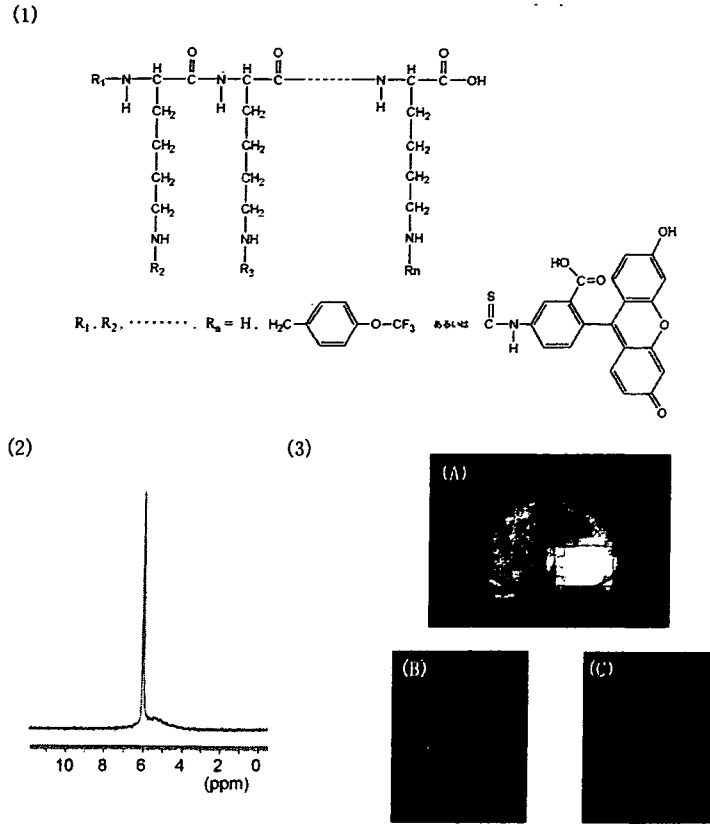


図4 光・磁場応答性マルチモーダル造影剤 (1) -ポリ-L-リジンを利用した例

- (1) 有機化学的に合成した光・磁場応答性ポリ-L-リジンの構造
- (2) 合成した試料の¹⁹F NMR スペクトル
- (3) A: マウス頭部の構造画像上での¹⁹F MRI B: 同一個体からの脳切片上の低倍率蛍光顕微鏡画像
C: B の高倍率での蛍光顕微鏡画像

域しか分からないが、マクロ蛍光顕微鏡を援用することで、そのような作業も可能になる可能性があった。そこで、われわれは、Hと同様、100%と非常に感度が高い核種である¹⁹Fを用いることで、MRIで可視化することを試みた。さらにその状態を蛍光でより細胞レベルで調べるために、FITCの蛍光色素を導入した。このプローブは、長さ1000個~3000個程度のポリ-L-リジンがつながったポリ-L-リジンを基にして、合成した(図4)。一次元NMRスペクトルでも1本の波形となり、MRIでの測定に問題がないことを確認した後、グリア細胞に投与し、脳内に移植した。移植2日後に、¹⁹F MRIで、脳内の中での移植細胞の位置が確認できるとともに、取り出した脳切片を蛍光顕微鏡による観察により、単一細胞レベルでの局在も確認することができた。以上の結果は、光と磁場によるマルチモーダルナノプローブと2つのイメージング手法を組み合わせることで、マクロレベルの細胞位置情報から、マイクロレベルの細胞形態までを一度に観察することができることを意味する。

しかしながら、こうしたペプチド性のプローブは、プロテアーゼなどの酵素による分解などに