

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20年度 総括研究報告書

主任研究者 森田将史

平成21(2009)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. 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	----- 5
小松直樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 8

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。

今年度は、①長期安定化プローブとして利用できるようにするためのND造影剤の合成技術の改善、および②マルチモーダル計測デバイスの開発に必要な技術基盤の開発を行った。まず、①のND造影剤の合成では、磁場応答性と光応答性について、それぞれ以下の結果を得た。まず、磁場応答性については、 $Mn^{2+}$ イオン注入後に、アニール処理と空気酸化処理を行うことで、当初目標にしていた $T_1$ 短縮能を持つMn-ND造影剤の合成に成功した。②のマルチモーダルイメージング技術基盤の開発では、新規フェムト秒レーザーによる光学システムを構築した。

### 分担研究者

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、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M

R信号の線幅が広がってしまい、メタボミクスの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<sup>+</sup>を $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 打ち込んだ(Mn-ND)。その後、アニール処理、空気参加処理を順次施した。合成された磁性NDの物性は、X-band ESR (JES-TE300, JEOL)、Spring-8での軟X線分光、X線分光により、それぞれ調べた。

### 2. MRI測定

イオン注入したND(Mn-ND)は、1%または0.5%アガロースゲルに包埋した。T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>強調画像(T<sub>1</sub>WI, )およびT<sub>1</sub>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。T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>強調画像(T<sub>1</sub>WI, T<sub>2</sub>WI)は、spin echo法による撮像した(T<sub>1</sub>WI: TR = 250 or 300ms, TE = 20 or 30 ms, FOV = 40 x 40 mm<sup>2</sup>, matrix = 512 x 256; T<sub>2</sub>WI: TR = 3 s, TE = 100 ms, FOV = 60 x 60 mm<sup>2</sup>, matrix = 256 x 128)。

### 3. 軟X線分光実験

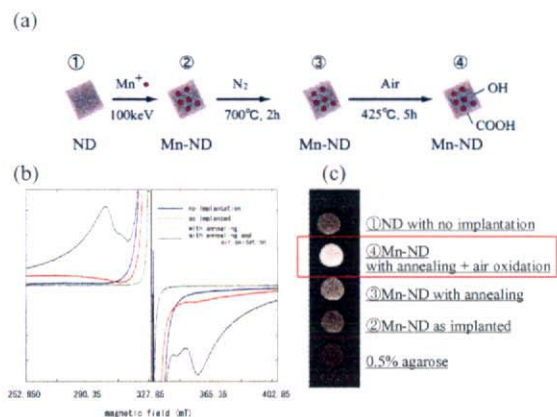
イオン注入後のND内部でのMnイオンの電子状態を調べるために、L殻励起吸収スペクトルを取得し、注入後の処理条件の検討、および処理後の2価のMnイオンの割合を探ることを目的とした。入射光に水平な面内に光電子分析器と軟X線分光器を配置する。光電子分析器は、Au4fを用いた入射光エネルギー補正、及び高次光補正用に用いる。試料面への入射角は斜入射70°に固定する。軟X線分光器のエネルギー軸及び分解能調整にはSiO<sub>2</sub>鏡面の乱反射スペクトルを用いる。試料には、 $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ のMnイオンを注入した4nmのナノダイヤモンドND(Mn-ND as impla.)とアニールしたもの(Mn-ND with anneal)、さらにアニール後にさらに空気酸化したものとアニールせずに空気酸化したものとアニールせず+air oxidation)を用いた。サンプルは、10mm<sup>2</sup>

x0.5mm程度の大きさのペレットとした。これらの試料のMn L-edge 軟X線発光および蛍光スペクトルを、BL27SUを用いて測定した。測定は室温で行った。

## C. 研究結果

### 1. NDのT<sub>1</sub>短縮効果について

イオン注入、および後処理工程の合成スキームは、図1(a)にあるように行った。まず、ESRで、その効果を見ると、アニールと空気酸化の両方処理したMn-NDのみ6本の高スピン信号が見られた。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T<sub>1</sub>強調画像と比較したところ、アニールと空気酸化の両方処理したMn-NDのT<sub>1</sub>短縮能が大きかった。



図：(a)イオン注入法による磁性NDの合成方法 (b) X-band ESR アニール+空気酸化処理したMn-NDのみ6本の高スピン信号が見られた (c)処理後の各T<sub>1</sub>強調MRI画像 アニールと空気参加したMn-ND(□)が最もT<sub>1</sub>短縮能が高かった。

### 2. ND内部のMnイオンの電子状態について

1のデータから、注入したイオンが2価の高スピン状態を持つことがわかったが、注入したイオンのどれ程度の割合が、高スピンになっているかを調べるため、Spring-8でのMn L端軟X線分光を用いて調べた。この方法は、すべての電子状態を調べることができるからである。その結果、イオン注入直後のMnイオンは、2価と3価が共存したが、真空中での700°C、2時間のアニールにより、MnOのスペクトルとピークが



一致したことから、ほぼすべてのMnイオンが2価の状態になり、③アニール後の425℃、5時間の空気酸化でも、Mnイオンは2価のまま、変化しなかった。以上の結果から、MRIに効果があると期待される常磁性イオンである2価の電子状態をとるようにするには、アニールが必要であることが分かった。

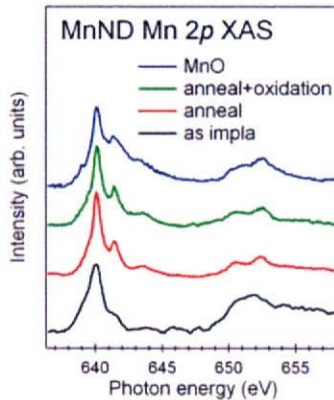


図: SPring-8で取得したMn2p吸収スペクトル(XAS)

さらに、DFT計算により、ダイヤモンド結晶構造中にエネルギー的に安定にMnイオンが高スピンで局在できることがわかった。

以上、磁場・光応答性マルチモーダル造影剤の開発において、放射光分光と、理論計算からのND中での構造・電子状態の安定性に関する原理追及を合わせて行うことで、今後臨床応用段階に進むための効率的な大量造影剤合成の方法論を確立することに成功した。



図2. イオン注入法による効率的なダイヤモンドMRI造影剤の合成のための実験デザイン

### 3. マルチモーダルイメージング用デバイスの開発

11.7T高磁場MRI装置内で生体レベルのMRI画像と細胞レベルの蛍光画像を同時取得するため、RFコイル内にマウス・ラット等のモデル動物へファイバーを用いて近赤外領域の波長(690~1020nm; Spectra Physics社 Maitai)のフェムト秒レーザー刺激光を送送するファイバーシステムを構築した。現在は、ファイバーバンドルを行っているが、すでに第二世代のシステムとして、PCF(フォトニッククリスタルファイバー)を用いたシステムを現在構築中である。

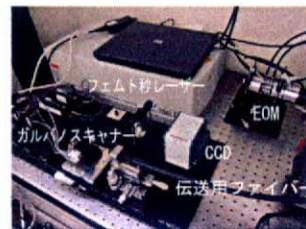


図: マルチモーダルデバイスの光学部分のプロトタイプシステム: 右下の伝送用ファイバーが、ショット社の協力を得て作成したバンドルファイバー

### 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、効率的なT<sub>1</sub>短縮造影剤の合成に成功した。現在、効率的な表面修飾技術も確立しつつあり、将来的な臨床応用可能な造影剤開発につなげていきたい。こうした造影剤が合成できれば、MRSによるメタボノミクス解析と組み合わせることが可能になり、より詳細な生理情報を取得でき、低侵襲医療技術としてのMRIの可能性がさらに広がると期待される。

### E. 結論

NDへのイオン注入法によるMRI造影剤合成法という新しい造影剤合成法を提案し、T<sub>1</sub>短縮効果を持つND粒子の合成に成功した。

## 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) DJ-1 protects against neurodegeneration caused by focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. Yanagisawa D, Kitamura Y, Inden M, Takata K, Taniguchi T, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tooyama I, Taira T, Iguchi-Aruga S, Akaike A, Ariga H. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 28: 563-78 (2008)

### 2. 学会発表

・MRI・蛍光による分子・細胞イメージング技術、森田将史，第64回日本放射線技術学会シンポジウム (2008) 2008年4月

・小松直樹、西村直子、瀧本竜哉、犬伏俊郎、森田将史、山室勝治、川野輪 仁、長町信治、“ナノダイヤモンドを用いたマルチモーダル分子イメージングプローブの創生” ポスター発表、バイオビジネス2008 in びわ湖、2008年11月6、7日、長浜

## 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

微細粉末へのイオン注入方法、森田将史、犬伏俊郎、小松直樹、長町信治、川野輪 仁、西田幸子. 特願2008-176865 (2008)

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. 研究方法と結果

1. 高温高压法で合成したND表面への修飾反応

本研究で用いた高温高压法により合成されたナノダイヤモンドは、合成過程で用いた金属分を取り除くために酸処理がなされており、その表面は水酸基、カルボキシル基等、酸化的な官能基を多く含んでいる。まず、安藤らの方法に従い、水素気流下、加熱することによりナノダイヤモンド(ND)表面を水素化した(図1)。その赤外吸収スペクトル(図2)は、水素化前に存在した水酸基、あるいはカルボニル基由来の吸収が消失し、 $3000\text{ cm}^{-1}$  付近のC-H

由来の吸収のみになっており、ND表面は、ほぼC-Hのみになっていると考えられる。また、表1に示した元素分析の結果でも、水素化前に10%程度存在した酸素は、水素化後は検出されず、水素化によりナノダイヤモンドは、ほぼC、Hのみになったことが示された。次に、水素化ナノダイヤモンドを $300^\circ\text{C}$ 、塩素ガス気流下で反応させた後、続けてアンモニアガスを流し、電気炉の温度を $450^\circ\text{C}$ にし、表面のアミノ化を行った(図1)。赤外吸収スペクトル(図2)は、C-H由来の吸収が減少し、新たにアミノ基由来の吸収が生じており、ナノダイヤモンド表面にアミノ基が導入されたことがわかる。また、元素分析により水素と窒素がともに1%程度検知されたことから(表1)、ND表面が、水素とアミノ基に制御されたことがわかる。

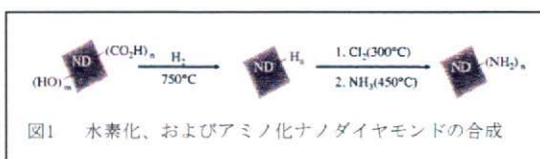


表1 官能基化ナノダイヤモンドの元素分析

Functional group	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)
-OH, -CO <sub>2</sub> H	87.58	0.74	0.40	10.25
-H	98.53	0.77	0	0
-NH <sub>2</sub>	96.79	0.79	0.80	-
-OCOCH <sub>3</sub>	97.05	0.95	0	1.72
-OH	93.20	1.21	0	1.33
-O <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> NH <sub>2</sub>	96.80	1.47	0.20	1.03



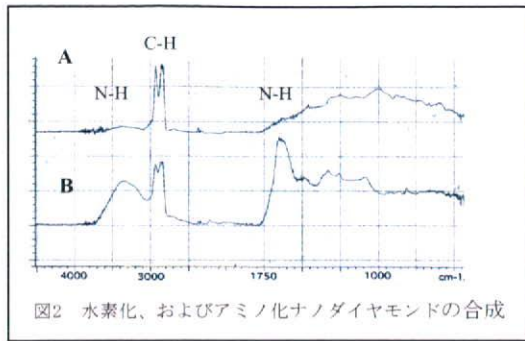


図2 水素化、およびアミノ化ナノダイヤモンドの合成

## 2. ナノダイヤモンド表面への蛍光体の付与

前項で合成したアミノ化NDに対し、アミド結合を介した蛍光体の付与を試みたが、残念ながら、蛍光NDを得ることはできなかった。これは、比較的大きな蛍光分子が、立体的な障害により、ダイヤモンド表面上のアミノ基に十分に接近することができず、反応できなかったためであると考え、アミノ基をダイヤモンド表面から少し距離を置いて配置できるような分子設計を行った。

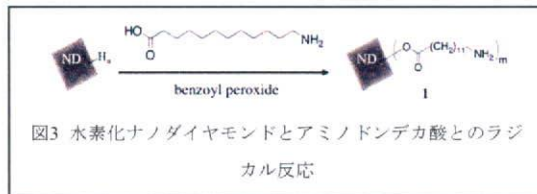


図3 水素化ナノダイヤモンドとアミノドデカ酸とのラジカル反応

先に得られた水素化ナノダイヤモンドに対し、坪田らの手法に従い、アミノアルキル基を導入した(図3)。前述のアセトキシル化にも用いた、坪田らにより開発された本反応は、エステル結合を介して、様々なカルボン酸をND表面に導入する優れた手法である。表1に示した元素分析では、水素化NDで検知されなかった窒素、酸素の存在が確認され、また、水素分の増加が見られた。以上のことは、窒素、酸素を含む長鎖アルキル基の導入、すなわち、1の生成を明確に示している。また、赤外吸収スペクトル(図4)でも、 $3400\text{ cm}^{-1}$  付近のN-H、あるいは、 $1700\text{ cm}^{-1}$  付近のC=O由来の吸収が観測され、原料である水素化NDの赤外吸収スペクトル(図2)と比較すると、エステル結合を介してアミノアルキル基が導入されたことが、明瞭に理解できる。

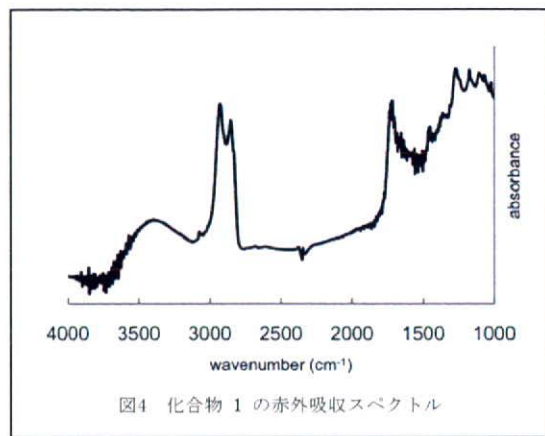


図4 化合物 1 の赤外吸収スペクトル

分子設計通りに、ND表面から距離を置いて配置したアミノ基に対し、図13に従い、Fluorescein という蛍光体を反応させた。反応物をよく洗浄した後に、蛍光顕微鏡により観察したところ、蛍光発光が確認された。

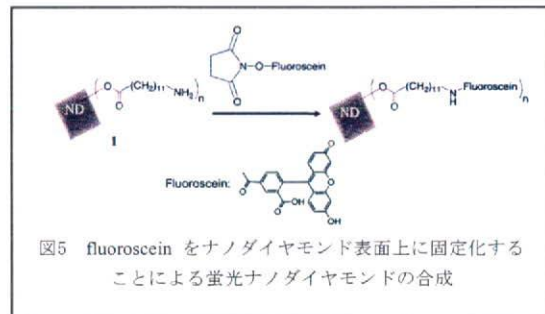


図5 fluorescein をナノダイヤモンド表面上に固定化することによる蛍光ナノダイヤモンドの合成

### (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. 考察

NDの安定した表面修飾方法の確立に成功した。今後は、多様な蛍光色素などを付加することを試みていく予定である。

## D. 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、細胞内中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

・小松直樹、西村直子、瀧本竜哉、犬伏俊郎、森田将史、山室勝治、川野輪 仁、長町信治、“ナノダイヤモンドを用いたマルチモーダル分子イメージングプローブの創生” ポスター発表、バイオビジネス2008 in びわ湖、2008年11月6、7日、長浜

## 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

微細粉末へのイオン注入方法、森田将史、犬伏俊郎、小松直樹、長町信治、川野輪 仁、西田幸子. 特願2008-176865 (2008)

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Yanagisawa D, Kitamura Y, Inden M, Takata K, Taniguchi T, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tooyama I, Taira T, Iguchi-Arigo S, Akaike A, Ariga H.	DJ-1 protects against neurodegeneration caused by focal cerebral ischemia and reperfusion in rats.	Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.	581	475-478	2008