

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究総括報告書

「MRI を用いた非侵襲的生体イメージングによる糖尿病の超早期診断法の開発」

研究分担者 富樫かおり 所属 京都大学 画像診断学・核医学

研究要旨：膵島量を直接的に定量する方法は糖尿病へと至る過程をより正確に反映すると考えられるが、超早期診断を行うには初期変化が軽微すぎて検出が困難となる可能性もある。そこでこれとは異なるアプローチとして、糖尿病へと至る過程で生じる膵島破壊に着目して、その病変に関与する貪食細胞の可視化による早期診断の検討を実施した。鉄剤にコーティングして数十 nm サイズとした USPIO 造影剤が活性化した貪食細胞に取り込まれる性質を利用して、膵島の変性過程を描出可能か検証を研究を行った。膵島への USPIO 集積は当初予想されたよりも低く、高分解能撮像が可能な 7T-MRI でも個々の膵島の変化は描出困難であった。生体内で膵島へ浸潤している貪食細胞の活性状態は *in vitro* で計測されている活性状態とは異なるのではないかと推測された。

A. 研究目的

ヒトが糖尿病を発症するまでには膵島の 70%以上が破壊されていると推測されている。ここに至るまでに膵臓に起きる組織学的変化を MRI を用いて、さらにその特長である非侵襲性を生かした診断方法を研究した。

糖尿病へと至る過程では膵島が障害されるが、それには貪食細胞の関与が指摘されている。残存膵島量を定量する以外にも、糖尿病の前段階で発生している破壊とこれに伴う炎症過程を特異的に検出することで、未発症段階での早期発見と予防・機能回復を図れる可能性がある。この点に着目して MRI により糖尿病の超早期段階での非侵襲的な診断方法に関する研究を行った（稲垣教授、松田教授との共同研究）。

B. 実験手法

貪食細胞に対する表面マーカーを対象とするアプローチがまず考えられるが、微小な膵島のさらに一部に浸潤しているこの細胞を本手法で選択的に描出することは困難と考えられた。しかし異なる方法として、貪食細胞が本来有する機能を活用することが可能ではないかと考えられる。生体内の細網内皮系に集積して MRI でコントラストを示す金属(Gd, Mn, Fe)を有するコロイド様製剤が対象となる。しかし Gd, Mn では人体に対する毒性問題を回避できない可能性があるため、Fe 製剤を対象として検討を進めた。代表的な Fe 製剤としては超常磁性酸化鉄粒子 (superparamagnetic iron oxide particles: SPIO) 製剤が挙げられる。通常量の静脈投与により生体内の肝臓や脾臓、骨髄等の細網内皮系に摂取される量が多く、破壊が進行する組織

への集積は必ずしも高くないと推測された。これに対して、粒子サイズがより小さな微小超常磁性酸化鉄粒子 (ultra-small super-paramagnetic iron oxide particles: USPIO) 製剤は炎症組織や梗塞後組織、リンパ節などへの集積が報告されておりより適切と考えられた。

Mowat らの報告 (2007) によれば、7T の動物実験用 MRI 装置を用いた 70x70x70 μm の解像度での撮像により、ゲルに包埋したファントム内にある SPIO でラベルした単核球を個別に同定可能であった。また使用する Fe 量は先行研究に基づき 300 $\mu\text{mol Fe/kg}$ とした (Retz F, et al. 2000; Brochet B, et al. 2006)。より膵臓という呼吸・拍動によるアーチファクトが生じやすい領域で少しでも強く信号変化を検出するために、アーチファクトを抑える撮像方法の検討やこれまでも報告のある位相変化や拡散情報を収集する手法に関しても検討を行ったが、それらはヒトでは適用可能なものの、7T という非常に高い静磁場とマイクロン単位の高解像度では適用が困難であった。

そこで生後 7、11、13 週の I 型糖尿病モデル NOD マウスを対象として定量的に T2 値の変化を検討することとした。USPIO 300 $\mu\text{mol/kg}$ を尾静脈より投与して、生後 7 週目のマウスは 18、36 時間後に、生後 11、17 週のマウスでは 36 時間後に撮像を行った。対照として糖尿病モデルではない生後 12 週 ICR マウスに対して同量の投与を行い比較した。各条件で使用されたマウスは 1-2 匹である。

撮像には動物用 7T-MRI 装置を使用し、呼吸同期を併用した。T1WI により膵臓の位置を同定後 (図 1)、T2WI を異なる TE 値 (12-192 ms) で撮像して T2 値を

推定した(図2)。面内解像度は $234 \mu\text{m}$ 、スライス厚は 0.5mm とした。

MRI 撮像後に膵臓を摘出して $5 \mu\text{m}$ の切片として HE 染色を行い膵臓の障害程度を評価した。

評価指標 0:変化なし、1:膵島周囲への単核球浸潤、2:膵島の 1/3 より少ない領域への同浸潤、3:1/3 以上 1/2 より少ない領域への同浸潤、4:1/2 以上の領域への同浸潤

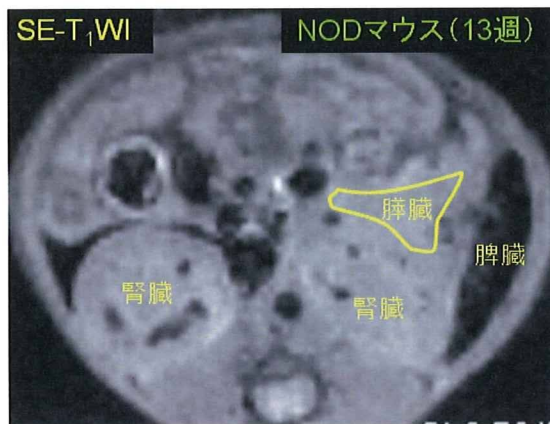


図1. 13週齢のNODマウスでの参照解剖画像例(膵臓部分を黄色の枠線で表示)

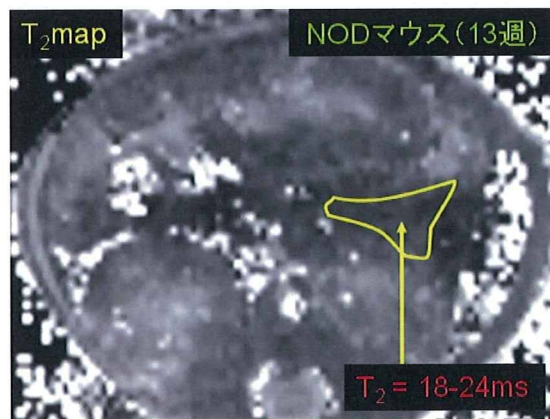


図2. USPIO $300 \mu\text{mol/kg}$ 静注 36 時間後

C. 実験結果

病理標本解析では 7 週では膵島障害スコアは 0.82 とごく軽度の変化のみであったのに対して、11 週では 1.77、13 週では 2.25 とより強い障害が認められたが、13 週の時点でも糖尿病と考えられる臨床症状は殆ど無かった。

MRI 画像の評価では、USPIO 静注後 18 時間の時

点で生後 7 週のラットで USPIO によると考えられる大きな T2 値の低下が認められたが、この時点では膵島に病理学的な変化はなく、血管内に残っている USPIO の影響が大きいと考えられた。これに合致するように 36 時間の時点で T2 値の低下は減少した。膵島自体に単核球の浸潤が明瞭に認められた11、13週でも同様に T2 値の低下は認められたが、7週との比較ではその減少幅はわずかであった(図3)。コントロールとの比較では T2 値の低下幅は大きく、これは血管内に残る USPIO の影響および単核球以外に局所に集積する機序を示唆するものと考えられたが、病理画像からの特定はできなかった。

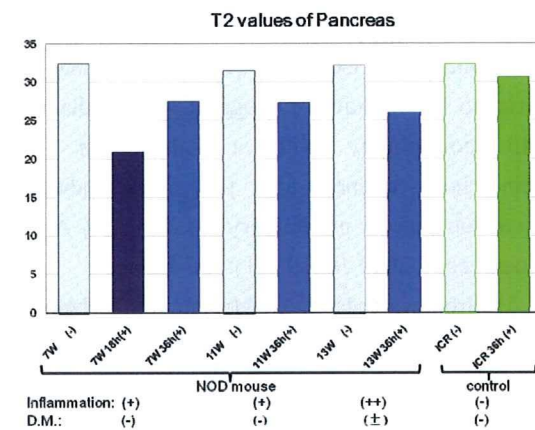


図3.

D. 結論

USPIO 集積による MRI 画像での信号変化は当初期待されたよりもはるかに少なく、単核球の貪食能は in vitro で観察されたものよりも低いのではないかと推測された。本方法により生体内の膵島障害を反映する早期の変化を予測することは現状では困難ではないかと考えられた。

E. 健康危険情報 特になし。

F. 研究成果(○:腹部画像・MR 撮像技術関連論文)

1. 論文

○1) Hirokawa Y, Isoda H, Okada T, Arizono S, Shimada K, Yamamoto A, Shibata T, Togashi K. Improved Detection of Hepatic Metastases From Pancreatic Cancer Using Periodically Rotated Overlapping Parallel Lines With Enhanced

Reconstruction (PROPELLER) Technique After SPIO Administration. Invest Radiol. 45(3):158-164, 2010

2) Nakatani K, Nakamoto Y, Saga T, Higashi T, Togashi K. The potential clinical value of FDG-PET for recurrent renal cell carcinoma. Eur J Radiol. 2009 Dec 14. [Epub ahead of print]

3) Satogami N, Okada T, Koyama T, Gotoh K, Kamae T, Togashi K. Visualization of external carotid artery and its branches: non-contrast-enhanced MR angiography using balanced steady-state free-precession sequence and a time-spatial labeling inversion pulse. J Magn Reson Imaging. 2009 Sep;30(3):678-83.

4) Shimada K, Isoda H, Okada T, Kamae T, Arizono S, Hirokawa Y, Togashi K. Unenhanced MR portography with a half-Fourier fast spin-echo sequence and time-space labeling inversion pulses: preliminary results. AJR Am J Roentgenol. 2009 Jul;193 (1):106-12.

○5) Hirokawa Y, Isoda H, Maetani YS, Arizono S, Shimada K, Okada T, Shibata T, Togashi K.

Hepatic lesions: improved image quality and detection with the periodically rotated overlapping parallel lines with enhanced reconstruction technique--evaluation of SPIO-enhanced T2-weighted MR images.

Radiology. 2009 May;251(2):388-97.

7) Kasahara S, Miki Y, Mori N, Urayama S, Kanagaki M, Fushimi Y, Maeda C, Sawamoto N, Fukuyama H, Togashi K. Spin-echo T1-weighted imaging of the brain with interleaved acquisition and presaturation pulse at 3 T: a feasibility study before clinical use.

Acad Radiol. 2009 Jul;16(7):852-7.

○8) Gotoh K, Okada T, Miki Y, Ikedo M, Ninomiya A, Kamae T, Togashi K. Visualization of the lenticulostriate artery with flow-sensitive black-blood acquisition in comparison with time-of-flight MR angiography. J Magn Reson Imaging. 2009 Jan;29 (1):65-9.

○9) Arizono S, Isoda H, Maetani YS, Hirokawa Y, Shimada K, Nakamoto Y, Shibata T, Togashi K.

High spatial resolution 3D MR cholangiography with high sampling efficiency technique (SPACE): comparison of 3T vs. 1.5T. Eur J Radiol. 2010 Jan;73(1):114-8.

2. 学会発表 なし。

3. 刊行物 なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

「非侵襲的生体膵島イメージングに必要な超高磁場MRIによる膵島撮像法の開発」

研究分担者 松田 哲也 京都大学情報学研究科 教授

研究要旨： 膵島量の定量化を行うための MRI 撮像技術の開発を目的とし、動物用の超高磁場 MRI 装置において非造影または造影 ^1H MRI による膵島の描出を試みたが、周囲組織との膵島の明瞭な識別は困難であるとの結論に達した。そこで、生体内にほとんど存在せず、 ^1H に次いで検出感度が高い ^{19}F の信号をもつ化合物を MRI プローブとして利用することによって高感度かつ定量的な膵島イメージングが可能となると考え、他研究分担者によって合成された膵島特異的なプローブ存在下、撮像検討実験を行った。単離膵島に暴露したプローブの ^{19}F NMR 信号が確認され、プローブを利用した膵島検出が可能であること、また膵島量とプローブの ^{19}F NMR 信号強度が比例することが確認され、定量的評価が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、糖尿病の超早期診断のために、定量的な膵島量の評価方法としての非侵襲的な生体内膵島の画像化の技術開発を行うことを目的としている。本分担研究者は動物用の超高磁場 MRI 装置を用いた膵島イメージングを担当し、特に膵島量の定量化に向けた MRI 撮像技術の開発を目的としている。

B. 研究方法

MRI による膵島量の測定では、小動物用の超高磁場 MRI 装置を利用して、 ^1H MRI による膵島の描出および分子プローブを用いた ^{19}F MRS による膵島の検出に関する評価実験を行った。

1. 高分解能 ^1H MRI 測定による膵島描出法の検討

小動物用 MRI 装置においては *in vitro* から

in vivo まで膵組織を対象に、 $200\mu\text{m}$ から $50\mu\text{m}$ 程度までの高分解能 MRI 画像を様々な MRI 撮像パラメタを用いて測定することが可能である。*In vitro* の系では、分担研究者豊田らの協力により GFP を発現する膵島を持つトランスジェニックマウスを利用し、摘出膵組織の一部をアガロースに包埋したサンプルを用い、事前に膵島の分布を蛍光顕微鏡下で3次元マッピング化し、これを参照することによって様々な条件で撮像した MRI 画像において膵島の描出能について検討した。

2. 分子プローブを用いた ^{19}F MRS 測定による膵島検出の検討

分担研究者の佐治・天満らによって設計・合成された分子プローブを用いた。分子プローブ溶液に単離膵島を暴露し、一定時間後プローブ溶液を洗い流して取り出した膵

島に対して高磁場 MRI 装置において ^{19}F MRS 測定を行った。またターゲットとする結合部位の特異性を検証するため、分子プローブへの暴露を行う前に ^{19}F を含まない化合物への暴露を行うブロッキング実験を行ったサンプルに対して ^{19}F MRS 測定を行った。

C. 研究結果

1. GFP の 3 次元蛍光像と比較し T_1 強調像において腓島部が周囲組織に比べわずかながら高信号領域として描出できる可能性を示唆する結果を得た。しかし、腓島部が T_1 強調像で高信号像として一定して得られず、また T_2 強調像や拡散強調像、あるいは *in vivo* において Gd 造影剤を投与し摘出した腓組織を用いても、腓島を周囲組織と明瞭に区別可能な像が得られなかった。またホルマリン固定した摘出腓組織およびアガロースに包埋した組織切片を用い、同条件で測定したところ両サンプルで腓島部と周囲組織が異なるコントラストを示した。

2. GPR40 のリガンドである化合物 GW9508、あるいは GLP-1 受容体のリガンドである化合物 BTFM12 の両者ともに腓島サンプルより ^{19}F MRS 信号が検出された。また化合物 GW9508 に対しては、750~12000 個までの腓島数に対し、化合物 GW9508 由来の ^{19}F MRS 信号強度が直線的に増加することが確認された。しかし、化合物 GW9508、化合物 BTFM12 とともに腓島への特異的結合評価のために行ったブロッキング実験のサンプルにおいては ^{19}F MRS 信号が得られないものがあり、一定した結果が得られなかった。

D. 考察

^1H MRI による腓島イメージングにおいては、サンプルの調製方法によって腓島部と周囲組織のコントラストが異なることや、同一サンプル調製条件下においても腓島描出能

が一定しないことから非造影あるいは市販の造影剤を用いた MRI 撮像による腓島描出は困難であると考えられる。

プローブを用いた ^{19}F MRS/MRI においてはプローブに暴露した腓島から信号が検出されたことから、腓島へのプローブの結合が示唆され、腓島の検出が可能であると考えられる。しかし、ブロッキング実験において、また、異なる種の腓島を用いた実験においては、 ^{19}F 信号が得られない場合もあり、受容体への親和性および特異性の検討が必要である。

E. 結論

非造影あるいは現在市販されている MRI 造影剤を用いた ^1H MRI 画像による腓島イメージングは困難であると判断した。

プローブを利用した ^{19}F MRS/MRI による腓島検出が可能であること、また腓島量とプローブの ^{19}F NMR 信号強度が比例することから、定量的評価が可能であることが示唆された。今後さらにプローブの腓島への結合特異性の検証を進める必要がある。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiota K, Yamada S, Nakatsu-Komatsu T, Uwabe C, Kose K, Matsuda Y, Haishi T, Mizuta S, Matsuda T. Visualization of human prenatal development by magnetic resonance imaging (MRI). *Am J Med Genetics Part A*, 143A, pp3121-3126, 2007
2. Nobuaki Y, Amano A, Shimayoshi T, Lu J, Shim EB, Matsuda T. A Model for Simulation of Infant Cardiovascular Response to Orthostatic

Stress. Proc. Func. Img. and Model. of Heart, LNCS4466, pp190-199, 2007.

3. その他

3. An Approximation Model of Myocardial Crossbridge for Weak Coupling Calculation of Left Ventricle Model and Circulation Model, Akira AMANO, Yasuhiro TAKADA, Jianyin LU, Takao SHIMAYOSHI, Tetsuya MATSUDA, Proc. IEEE EMB Conference, pp.957-960, 2008.

4. Takaoka Y, Sakamoto T, Tsukiji S, Narazaki M, Matsuda T, Tochio H, Shirakawa M, Hamachi I, Self-assembling nanoprobe that display off/on ^{19}F nuclear magnetic resonance signals for protein detection and imaging. Nature Chemistry, 1, pp557-561, 2009

5. Tanabe K, Harada H, Narazaki M, Tanaka K, Inafuku K, Komatsu H, Ito T, Yamada H, Chujo Y, Matsuda T, Hiraoka M, Nishimoto S, Monitoring of Biological One-Electron Reduction by ^{19}F NMR Using Hypoxia Selective Activation of an ^{19}F -Labeled Indolequinone Derivative. J Am Chem Soc, 131, pp15982-15983, 2009

2. 学会発表

1. A Tracking Algorithm for Three Dimensional Tags in Cardiac MRI.

Shimizu Y, Jin X, Amano A, Matsuda T,

Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 15 (2007) pp2547, Berlin, 19-25, May 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

「非侵襲的生体膵島イメージングのためのグルコース誘導体の開発」

研究分担者 齊藤美佳子 東京農工大学 共生科学技術研究院 生命機能科学部門

研究要旨：2型糖尿病患者数は増加の一途をたどっており社会的な問題となっている。この対策には、超早期診断開発のため、非侵襲的生体内の膵島量を計測できるイメージング技術が必要である。本研究では、GLUT2の基質として2-デオキシグルコースに着目し、その標識方法の検討および標識合成の高純度化、高効率化を図ると共に、哺乳動物細胞へ取り込ませることでその有用性を示すことができた。

A. 研究目的

糖尿病を早期に診断することができれば、効果的な糖尿病発症予防が可能となる。そこで本研究は、糖尿病の超早期診断のために生体内の膵島量を非侵襲的な画像診断法を用いて定量化することを究極の目的としている。標的候補として GLUT2 を選び、特に基質として 2-デオキシグルコースを基質とした標識方法と利用法の開発を目的としている。既に GLUT2 着目した試みもなされており、グルコース輸送体に着目した考えは合理的ではあるが、GLUT2 のどのような機能に着目するかについては、超早期の観点から見直す必要があると考えられる。超早期の指標として考えるならば、グルコース輸送体自体の動的性質を高い解像度で調べなおす必要があると考えられる。そのためには、膵島細胞におけるグルコース輸送のダイナミズムを細胞が生きた状態でリアルタイム解析することが必要と考えられる。

蛍 光 グ ル コ ー ス

(2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminol]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) は、トランスポーター変異株を用いた実験により、大腸菌ではマンノーストランスポーター、及びグルコーストランスポーターを介して取り込まれることが示されている。一方、哺乳動物細胞によっても取り込まれることが示されており、D-グルコースによる競争的阻害反応によって GLUT 系のトランスポーターを介して取り込まれていることが推定されている。

これらの結果に基づき、2-NBDG を哺乳動物細胞におけるグルコース代謝活性の可視化に利用する試みが報告されている。しかし、哺乳動物細胞では非特異的取り込み、あるいは吸着によると思われる蛍光がしばしば観測されるため、実験条件の最適化が困難であった。そのため、コントロールとしての L-グルコース誘導体の 2-NBDG (2-NBD-LG) の開発が望まれていた。幸い、(株)タンパク研の山本によって、2NBD-LG 合成の原料である L-グルコサミンが新規合成され、それを用いた 2-NBD-LG の合成にも成功した。L-グルコサミンは極めて貴重な試薬であるので、これと NBD-Cl とを反応過程、および生成物の精製過程の効率を向上させることが重要となった。本研究は、以上の背景により、2-NBDG の高純度化、高効率化を図ると共に、哺乳動物細胞へ取り込ませることでその有用性について評価することとした。

B. 研究方法

(1) 蛍光グルコースの合成

反応時の溶媒の種類として、メタノール、アセトニトリル、酢酸メチル、酢酸エチル、エタノールについて比較検討した。D-グルコサミン 200 mg、NaHCO₃ 100 mg、H₂O 4 mL を混合し溶液 A とした。50 mL ナスフラスコに NBD-F 23 mg を入れ、これに上記の溶媒のいずれかを 2 mL を加えて溶解したのち、溶液 A を 4 mL 加え、37°C、暗所で攪拌しながら反応させた。一定時間毎に反応液 10 μL を分取し、アセトニトリルで 1/20 に希釈して、

HPLC で分析した。

(2) 合成品の分光学的特性解析

蛍光スペクトル、励起スペクトル、NMR スペクトルなどを計測し、比較した。

(3) 構造異性体の確認

グルコースの 1 位の炭素に結合した水酸基の向きによって α 体と β 体が混在するとされてきた。しかし、それぞれに対応する HPLC でのピークの高さが、調製の度に異なっていたため、不純物の混入が懸念された。そこで、HPLC で得られた 2 つのピークのそれぞれを個別に取得した後、再度、HPLC に注入してピークの位置および形状を調べた。

(4) 保存条件の検討

保存時の温度、pH、置換気体の 3 つの条件について検討した。

(5) 微生物細胞への取り込み活性測定

グルコーストランスポーター、マンノーストランスポーター、などの糖輸送体を介した取り込み機能について詳しい解析データのある大腸菌生細胞を用いて、新規合成品と従来の蛍光グルコースとの比較をした。

(6) 哺乳動物細胞への取り込み活性測定

実験に用いた細胞として、マウス ES 細胞と線維芽細胞を用いた。3.5 cm ガラスベースディッシュに播種した細胞を Na HEPES solution で洗浄後、再度 Na HEPES solution を加えて 0~30 分間培養した。Na HEPES solution を除去し、50 μ M の 2-NBDG または 2-NBDLG を加え 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、湿度 95% の条件下で培養した。一定時間培養後、2-NBDG または 2-NBDLG を除去し、Na HEPES solution で 2 回洗浄後、培養培地を加え、共焦点顕微鏡により、蛍光画像を取得し ROI ツールで平均蛍光強度を算出し取り込み活性を解析した。さらに、マウス ES 細胞では、未分化状態を維持するために必要な LIF を除いて培養した細胞においても、蛍光グルコースの取り込み活性を解析した

C. 研究結果

(1) 蛍光グルコースの合成

HPLC 分析チャートより、2-NBDG と思われるピークの高さから反応量を見積もった。

メタノール、アセトニトリル、酢酸メチル、酢酸エチル、エタノールについて 2-NBDG の生成量を調べたところ、エタノールの場合が最大で、以下、エタノール、アセトニトリル、酢酸エチルの順になり、酢酸メチルでは殆ど生成されなかった。従来から用いていたエタノールが最適であった。次に反応の原料として NBD-Cl より反応性が高いと予想される NBD-F を用いた。その結果、NBD-Cl では最大生成収率が 20%であったのに対して、

NBD-F の場合は、10 分で最大生成収率 60%に達し、反応効率を約 3 倍向上させることに成功した(図 1)。

(1) 蛍光グルコースの

分光特性

図 1 NBD-F と NBD-Cl の合成効率の比較
蛍光スペクトル、励起スペクトル、NMR スペクトルのいずれにおいても、以前の方法で得られた
蛍光グルコースと同じ分光特性を示した(図 2、図 3)。

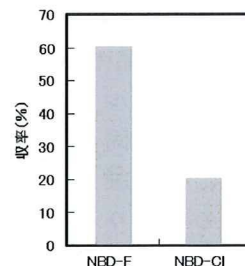


図 2 2-NBDG の蛍光スペクトル

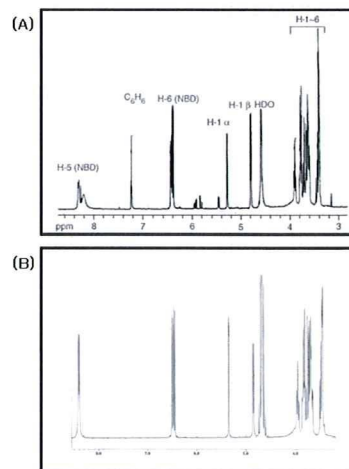


図 3 2-NBDG の NMR スペクトル
(A) NBD-Cl 由来、(B) NBD-F 由来

(2)構造異性体の確認結果

フラクションコレクターを用いて2本のピークのそれぞれを個別に取得した後、時間変化とともにピーク変化を測定したところ、どちらのピークも単離直後は1本であったが、30分後には2本のピークが見られ、60分後には合成時と同様の2本のピークが見られた。

(3)最適保存条件

保存条件は、4℃、pH4.5~7.0、遮光下か最適であることがわかった。

(4)微生物細胞への取り込み活性評価結果

新規合成品の細胞への取り込み活性は、従来
の蛍光グルコースと同様に、生細胞のみ取り込み、死細胞では取り込まなかった(図4)。

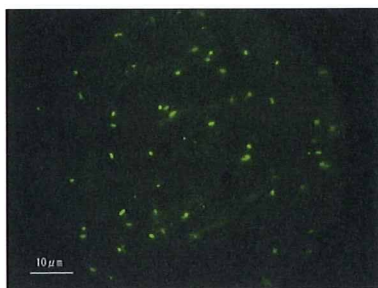


図4 2-NBDGを取り込んだ大腸菌

(5)哺乳動物細胞への取り込み活性測定

マウス ES 細胞および線維芽細胞共に、2-NBDG を細胞内に取り込むことがわかった。2-NBDLG も極わずかながら細胞内に取り込んでいることがわかったが、蛍光強度は、2-NBDG の方が強いことがわかった。また、経時的な解析から ES 細胞と線維芽細胞では2-NBDG の取り込み方に差が認められ ES 細胞の方が取り込み活性は高かった。さらに、LIF を除いて培養した ES 細胞を用いて2-NBDG の取り込み活性の変化を測定したところ、分化途中の細胞で最も高い蛍光強度値を示し、さらに分化が進行すると蛍光強度が減少することが明らかになった。

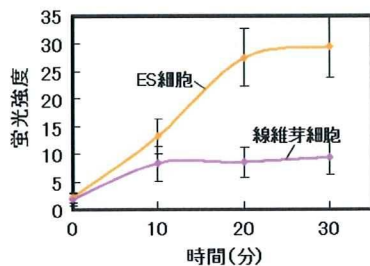


図5 ES 細胞と線維芽細胞の 2-NBDG 取り込み活性

D. 考察

当初、2-NBDLG は細胞膜への吸着と思われる蛍光観察を回避するためのコントロールとして開発されたものであるが、本実験においては、極わずかながら ES 細胞および線維芽細胞ともに細胞内に取り込んでいることがわかった。共焦点顕微鏡による観察結果から、グルコース輸送体を介した取り込みではなく、エンドサイトーシスによる取り込みではないかと考えられた。ES 細胞の方が線維芽細胞よりも 2-NBDG 取り込み活性は高かったことは、未分化な細胞の方が多くのエネルギーを必要とするためではないかと考えられた。しかし一方、LIF を除いた ES 細胞では、分化途中にある細胞が最も高い蛍光強度値を示したことから、形態の変化など細胞にダイナミックな変化が生じている細胞の方が、代謝を活発化させているために、2-NBDG の取り込み活性が高くなったのではないかと考えられた。

E. 結論

2-NBDG の合成時に L-グルコサミンと反応させる場合は NBD-Cl よりも、NBD-F を用いる方が有利であることが分かった。

新規に合成した化合物は、従来と同様の特性を有しており、以前作製した蛍光グルコースと同一であった。また、合成した2-NBDGを HPLCで分析した場合の2本のピークは、グルコースの α 体と β 体由来のものであることがわかった。

蛍光グルコースの取り込み活性を指標に、未分化な細胞と分化した細胞、さらには未分化な細胞と分化過程にある細胞を識別できる可能性があることがわかり、蛍光グルコースが複数の細胞への適用が可能であることがわかりその有用性を示すことができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fujioka K, Kozone I, Saito M and Hideaki Matsuoka. Automatic mapping of viable microbial cells distributed in the

surface layer of cotton fabrics. *Biocont. Sci.*, **12**(1), 31-34 (2007).

(2) Yamada K, Saito M, Matsuoka H and Inagaki N. A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells. *Nat. Prot.*, **2**(3), 753-762 (2007).

(3) Fujioka K, Geis P, Saito M and Matsuoka H. Visualization of yeast single-cells on fabric surface with a fluorescent glucose and their isolation for culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **34**(10), 685-688 (2007).

(4) Kodaka H, Mizuochi S, Saito M and Matsuoka H. Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Japanese surface waters. *J. Appl. Microbiol.*, **104**(4), 1112-1118 (2008).

2. 学会発表

(1) 畑 圭輔, 斉藤美佳子, 松岡英明, "生菌検出試薬としての 2-NBDG の特性解析", 日本防菌防黴学会第34回年次大会, 大阪 (2007年8月31日)

(2) 澤山成行, 島北寛仁, 永幡 肇, 斉藤美佳子, 松岡英明, "蛍光染色法による生乳中の細菌数と体細胞検出法の検討", 第144回日本獣医学学会学術集会, 北海道 (2007年9月2日)

(3) 藤岡耕太郎, 白井昭博, 高麗寛紀, 斉藤美佳子, 松岡英明, "超深焦点可変域顕微システムを使用した抗菌加工固層表面の抗菌作用機作の迅速評価方法の検討", 日本防菌防黴学会第35回年次大会, 浜松 (2008年9月12日)

(4) 末崎拓広, 島北寛仁, 斉藤美佳子, 松岡英

明, "密度勾配遠心分離法に基づく食品中微生物のバイアブルセパレーション", 日本防菌防黴学会第35回年次大会, 浜松 (2008年9月12日)

(5) 重富知也, 斉藤美佳子, 松岡英明, "生乳中微生物の非培養・培養トレーサブル検出", 日本化学会第89春季年会, 船橋 (2009年3月29日)

(6) 山本敏弘, 田中伸一, 西内祐二, 豊島 正, 長友克広, 越後瑠夏, 渡邊誠二, 菅 世智子, 水野靖紀, 重富知也, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明, 山田勝也, "蛍光グルコーストレーサー-2-NBDG の対掌体である 2-NBDLG とその誘導体の合成", 第29回日本糖質学会年会, 高山 (2009年9月11日)

(7) 末崎拓広, 重富知也, 水野靖紀, 島北寛仁, 斉藤美佳子, 舟橋久景, Carl Grenvall, Thomas Laurell, 松岡英明, "Acoustic cell separation technology による食品中微生物のバイアブルセパレーション", 日本防菌防黴学会第3回年次大会, 大阪 (2009年9月14日)

(8) 重富知也, 末崎拓広, 斉藤美佳子, 舟橋久景, 松岡英明, "食品中微生物の非培養・培養トレーサブル検出", 日本防菌防黴学会第36回年次大会, 大阪 (2009年9月14日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

「非侵襲的生体膵島イメージングに必要なプローブの作製」

研究分担者 平尾 佳 所属 アークレイ株式会社 研究開発部第5チーム

研究要旨：糖尿病の発症過程では、膵島量が耐糖能異常に先行して減少する。この知見に基づき、本研究では糖尿病超早期診断を目的とした、膵島量を測定する非侵襲的画像診断技術の開発を目標とする。このための新規分子プローブの開発を行う。標的分子の探索から開始し、それに基づく分子プローブの設計、作製と実験動物を用いた評価を行う。それに並行して、分子プローブの量産化検討及び、測定・解析システムの開発を行う。

A. 研究目的

現在、我が国における2型糖尿病は推定740万人を越えて増加し続けており、この対策として耐糖能検査を基準とした糖尿病発症前の介入が行われているが、十分な成果が得られていない。その原因として、機能異常が明らかとなる境界型糖尿病の段階では膵島の障害はすでに高度に進行しており、介入開始時期としては遅い可能性がある。よって、適切な時期の介入を行うための超早期診断の必要性が求められている。

よって、本研究の目的は、糖尿病の超早期診断のために生体内の膵島量を非侵襲的な画像診断法を用いて定量化するための技術開発を行うことである。

B. 研究方法

非侵襲的膵島定量に必要な分子プローブの開発と画像診断法の検討を、以下の4つの手順で行う。なお、京都大学分担分については、詳細を割愛した。

1. 膵島イメージング標的分子の選定
2. イメージング分子プローブの設計・開発
3. 標識分子プローブの基礎的評価 (*in vitro* ~ *ex vivo* まで)
4. *In vivo* における分子プローブの有効性と画像撮像条件の検討

平成19年度、20年度までの結果を元に、平成21年度は Exendin(9-39)の誘導体3種、GW9508の誘導体3種、Mitiglinide 誘導体の合計7種類の分子プローブ標識化を終了後に基礎的評価及び *in vivo* での有効性検討を行い、有用性が期待できる分子プローブの絞り込みを行い、さらなる性能向上のための改良を加える予定である。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験については、京都大学動物実験に関する指針に基づいて施行する。

C. 研究結果

下記12種類の分子プローブ合成・標識化を終了し、有効性検討を行なった。

- ・ GLP-1 受容体アンタゴニスト Exendin(9-39) : 4種の誘導体の合成・標識化終了。基礎評価終了。
- ・ GLP-1 受容体アゴニスト Exendin-4 : 2種の誘導体の合成・標識化終了。基礎評価終了。
- ・ GPR40/GPR120 のリガンド GW9508 : 3種類の誘導体の合成・標識化、基礎評価終了。
- ・ GPR40 のリガンド GW1100 : 3種類の誘導体の合成・標識化終了。基礎評価終了。

D. 考察

Exendin(9-39)及び Exendin-4 においては、合計 9 種類の誘導体での検討を行なった。その結果、標識部位、標識時のリンカー等により、分子プローブとしての性能に大きな差が認められた。これまでに蓄積してきた実験データから、性能に影響を与える要因の解明が進んできており、Exendin(9-39)及び Exendin-4 の更なる性能向上が可能であると考えられる。

また、GW9508、GW1100 においては、各 3 種類ずつの誘導体で検討を行なったが、脂溶性が高く、臓器集積性において問題があったため脂溶性を低下させる分子設計が必要であると判断した。

E. 結論

現在のところ、最も可能性の高い分子プローブは Exendin(9-39)及び Exendin-4 誘導体である。これまでの実験から得られた知見を基に改良を行い、最終的に実用性の高い分子プローブ開発が可能であると確信する。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

E. Mukai, K. Toyoda, H. Kimura, H. Kawashima, H. Fujimoto, M. Ueda, T. Temma, K. Hirao, K. Nagakawa, H. Saji, and N. Inagaki, GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 523-6, 2009.

2.学会発表 なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

PCT/JP2009/56628
特願2009-68837号
特願2009-68838号
特願2009-68839号
特願2009-204769号
特願2009-228658号
PCT/JP2009/066398
特願2009-185470号

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

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

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
Yamada, K., Saito, M., Matsuoka, H. et al	A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells.	Nat. Protocols.	2(3)	753-62	2007
Toyoda, K., Okitsu, T., Yamane, S., et al.	GLP-1 receptor signaling protects pancreatic beta cells in intraportal islet transplant by inhibiting apoptosis.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	367(4)	793-8	2008
Naitoh, R., Miyawaki, K., Harada, N., et al.	Inhibition of GIP signaling modulates adiponectin levels under high-fat diet in mice.	Biochem Biophys Res Commun.	376(1)	21-5	2008
Harada, N., Yamada, Y., Tsukiyama, K., et al.	A novel gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor splice variant influences GIP sensitivity of pancreatic {beta}-cells in obese mice.	Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.	294(1)	E61-8	2008
Yamada, C., Yamada, Y., Tsukiyama, K., et al	The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption.	Endocrinology	149(2)	574-9	2008
Kominato, R., Fujimoto, S., Mukai, E., et al.	Src activation generates reactive oxygen species and impairs metabolism-secretion coupling in diabetic Goto-Kakizaki and ouabain-treated rat pancreatic islets.	Diabetologia	51(7)	1226-35	2008
E. Mukai, K. Toyoda, H. Kimura, et.al.	GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging.	Biochem Biophys Res Commun	389	523-6.	2009

Liu X, Harada N, Yamane S, et.al.	Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice.	Life Sci	84	876-81	2010
Toyoda K, Fukushima M, Mitsui R, et al.	Factors responsible for age-related elevation in fasting plasma glucose: a cross-sectional study in Japanese Men.	Metabolism	57(2)	299-303	2008
Harada N, Fukushima M, Toyoda K, et al	Factors responsible for elevation of 1-h postchallenge plasma glucose levels in Japanese men	Diabetes Res Clin Pract	81(3)	284-9	2008
Noguchi H, Okitsu T, Matsumoto S, et.al.	Comparison of M-Kyoto solution and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution with a trypsin inhibitor for pancreas preservation in islet transplantation	Transplantation	84(5)	655-8	2007
Rivas-Carrillo JD, Okitsu T, Kobayashi N, et. al.	Cell-permeable pentapeptide V5 inhibits apoptosis and enhances insulin secretion, allowing experimental single-donor islet transplantation in mice	Diabetes	56(5)	1259-67	2007
Noguchi, H., Yamada, Y., Okitsu, T., et al.	Secretory unit of islet in transplantation (SUIT) and engrafted islet rate (EIR) indexes are useful for evaluating single islet transplantation.	Cell Transplant	17(1-2)	121-8	2008
Liu, X., Matsumoto, S., Okitsu, T., et al.	Analysis of donor- and isolation-related variables from non-heart-beating donors (NHBDs) using the Kyoto islet isolation method.	Cell Transplant	17(6)	649-56	2008
Sato E, Yano I, Shimomura M, et al.	Larger dosage required for everolimus than sirolimus to maintain same blood concentration in two pancreatic islet transplant patients with tacrolimus.	Drug Metab Pharmacokinet;	24(2)	175-9	2009
Aita, K., Temma, T., Kuge, Y., et al.	Development of a novel neodymium compound for in vivo fluorescence imaging	Luminescence	22(5)	455-61	2007

Kuge, Y., Kume, N., Ishino, S., et al.	Prominent lectin-like oxidized low density lipoprotein (LDL) receptor-1 (LOX-1) expression in atherosclerotic lesions is associated with tissue factor expression and apoptosis in hypercholesterolemic rabbits.	Biol Pharm Bull	31(8)	1475-82	2008
Ishino, S., Mukai, T., Kuge, Y., et al.	Targeting of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) with ^{99m} Tc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential agent for imaging of vulnerable plaque.	J Nucl Med.	49(10)	1677-85	2008
Kuge Y, Obokata N, Kimura H, et al.	Synthesis and evaluation of a radioiodinated lumiracoxib derivative for the imaging of cyclooxygenase-2 expression.	Nucl Med Biol.	36(8)	869-76	2009
Ono M, Watanabe R, Kawashima H, et al.	Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease.	J Med Chem.	52(20)	6394-40 1	2009
Ono M, Hayashi S, Kimura H, et al.	Push-pull benzothiazole derivatives as probes for detecting beta-amyloid plaques in Alzheimer's brains.	Bioorg Med Chem.	17(19)	7002-07.	2009
Maya Y, Ono M, Watanabe H, et al.	Novel radioiodinated aurones as probes for SPECT imaging of beta-amyloid plaques in the brain.	Bioconjug Chem.	20(1)	95-101	2009
Temma T, Iida H, Hayashi T, et al.	Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable (¹⁵ O)-O (2).	Eur J Nucl Med Mol Imaging.	37(2)	377-85	2009
Doue, T., Ohtsuki, K., Ogawa, K., et al.	Cardioprotective effects of erythropoietin in rats subjected to ischemia-reperfusion injury: assessment of infarct size with ^{99m} Tc-annexin V.	J Nucl Med	49(10)	1694- 1700	2008

Kiyono, Y., Sugita, T., Ueda, M., et al.	Evaluation of radioiodinated (2S,αS)-2-(α-(2-iodophenoxy)benzyl)morpholine as a radioligand for imaging of norepinephrine transporter in the heart.	Nucl Med Biol	35(2)	213-8	2008
Ueda, M., Iida, Y., Kitamura, Y., et al.	5-Iodo-A-85380, a specific ligand for α4β2 nicotinic acetylcholine receptors, prevents glutamate neurotoxicity in rat cortical cultured neurons.	Brain Res	1199	46-52	2008
Ueda M, Iida Y, Tominaga A, et al.	Nicotinic acetylcholine receptors expressed in the ventral posterolateral thalamic nucleus play an important role in anti-allodynic effects.	Br J Pharmacol.	159(6)	1201-10	2010
Kudo T, Ueda M, Kuge Y, et al.	Imaging of HIF-1-active tumor hypoxia using a protein effectively delivered to and specifically stabilized in HIF-1-active tumor cells.	J Nucl Med.	50(6)	942-9	2009
Hirokawa Y, Isoda H, Okada T, et al.	Improved Detection of Hepatic Metastases From Pancreatic Cancer Using Periodically Rotated Overlapping Parallel Lines With Enhanced Reconstruction (PROPELLER) Technique After SPIO Administration.	Invest Radiol.	45(3)	158-164,	2010
Nakatani K, Nakamoto Y, Saga T, et al.	The potential clinical value of FDG-PET for recurrent renal cell carcinoma.	Eur J Radiol.		[Epub ahead of print]	2009
Satogami N, Okada T, Koyama T, et al.	Visualization of external carotid artery and its branches: non-contrast-enhanced MR angiography using balanced steady-state free-precession sequence and a time-spatial labeling inversion pulse.	J Magn Reson Imaging	30(3)	678-83	2009

Shimada K, Isoda H, Okada T, et al.	Unenhanced MR portography with a half-Fourier fast spin-echo sequence and time-space labeling inversion pulses: preliminary results.	AJR Am J Roentgenol.	193 (1)	106-12	2009
Kasahara S, Miki Y, Mori N, et al.	Spin-echo T1-weighted imaging of the brain with interleaved acquisition and presaturation pulse at 3 T: a feasibility study before clinical use.	Acad Radiol.	16(7)	852-7	2009
Gotoh, K., Okada, T., Miki, Y., et al.	Visualization of the lenticulostriate artery with flow-sensitive black-blood acquisition in comparison with time-of-flight MR angiography.	J Magn Reson Imaging.	29(1)	65-9	2009
Arizono S, Isoda H, Maetani YS, et al.	High spatial resolution 3D MR cholangiography with high sampling efficiency technique (SPACE): comparison of 3T vs. 1.5T.	Eur J Radiol.	73(1)	114-8	2010
Shiota K, Yamada S, Nakatsu-Komatsu T, et al.	Visualization of human prenatal development by magnetic resonance imaging (MRI).	Am. J. Med. Genetics Part A	143A	3121-31 26	2007
Nobuaki Y, Amano A, Shimayoshi T, et al.	A Model for Simulation of Infant Cardiovascular Response to Orthostatic Stress.	Proc. Func. Img. and Model. of Heart, LNCS	4466	190-199	2007
Amano, A., Takada, Y., Lu, J., Shimayoshi, T., Matsuda, T.	An approximation model of myocardial crossbridge for weak coupling calculation of left ventricle model and circulation model.	Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc	1	957-960	2008
Takaoka Y, Sakamoto T, Tsukiji S, et al.	Self-assembling nanoprobe that display off/on ¹⁹ F nuclear magnetic resonance signals for protein detection and imaging.	Nature Chemistry,	1,	557-561	2009
Tanabe K, Harada H, Narazaki M, et al.	Monitoring of Biological One-Electron Reduction by ¹⁹ F NMR Using Hypoxia Selective Activation of an ¹⁹ F-Labeled Indolequinone Derivative.	J Am Chem Soc,	131	15982-1 5983	2009

Kodaka, H., Mizuochi, S., Saito, M., Matsuoka, H.	Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and Escherichia coli in Japanese surface waters.	J Appl Microbiol	104(4)	1112-8	2008
Fujioka, K., Kozane, I., Ozaki, M., et al.	Automatic mapping of viable microbial cells distributed in the surface layer of cotton fabrics	Biocont. Sci.	12	31-34	2007
Fujioka, K., Geis, P., Saito, M., et al.	Visualization of yeast single-cells on fabric surface with a fluorescent glucose and their isolation for culture	J. Ind. Microbiol. Biotechnol.	34	685-688	2007

A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells

Katsuya Yamada¹, Mikako Saito², Hideaki Matsuoka² & Nobuya Inagaki³

¹Department of Physiology, Hirosaki University School of Medicine, Aomori 036-8562, and CREST of Japan Science and Technology Agency, Honcho 4-1-8, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan. ²Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakamachi, Koganei, Tokyo 184-8588, and CREST, Japan. ³Department of Physiology, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, and Department of Diabetes and Clinical Nutrition, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, and CREST, Japan. Correspondence should be addressed to N.I. (inagaki@metab.kuhp.kyoto-u.ac.jp) about cell assays and to H.M. (mhide@cc.tuat.ac.jp) about 2NBDG synthesis.

Published online 29 March 2007; doi:10.1038/nprot.2007.76

This protocol details a method for monitoring glucose uptake into single, living mammalian cells using a fluorescent glucose derivative, 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG), as a tracer. This specifically designed chamber and superfusion system for evaluating 2-NBDG uptake into cells in real time can be combined with other fluorescent methods such as Ca²⁺ imaging and the subsequent immunofluorescent classification of cells exhibiting divergent 2-NBDG uptake. The whole protocol, including immunocytochemistry, can be completed within 2 d (except for cell culture). The procedure for 2-NBDG synthesis is also presented.

INTRODUCTION

Glucose is the major carbon source used in the cells of most organisms, so measurement of glucose uptake is an important research issue. In mammalian cells in particular, measuring glucose uptake of a heterogeneous population and/or differing activity status is of great interest^{1,2}. To quantify glucose uptake, a variety of radiolabeled tracers such as [³H] glucose², [¹⁴C] 2-deoxy-D-glucose (2-DG)³, [¹⁸F] fluoro-2-deoxy-D-glucose⁴ and [¹⁴C] or [³H] 3-O-methyl-D-glucose^{5,6} have been used effectively. However, the spatial and temporal resolution of these methods is not high, and they cannot be used to visualize glucose uptake in single, living cells.

This protocol details a method for real-time monitoring of glucose uptake in single mammalian cells using a fluorescent D-glucose derivative, 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG), as a tracer. 2-NBDG was initially developed for the rapid non-culture count of viable microbial cells and was successfully applied to *Escherichia coli*⁷ and many other food-borne bacteria⁸. It has since been demonstrated in living mammalian cells that the uptake of 2-NBDG takes place through glucose transporters (GLUTs) in a concentration-, time- and temperature-dependent manner⁹. A short-period application of 2-NBDG produced a remarkable increase in the fluorescence intensity in COS-1 cells over-expressing GLUT2, whereas the increase was barely detectable in mock-transfected cells⁹. In mouse insulin-secreting clonal MIN6 cells¹⁰, uptake was inhibited by cytochalasin B, a specific blocker for GLUTs, and by D-glucose in a dose-dependent manner⁹. Kinetic analysis using fluorometry further revealed that the time course of the uptake into MIN6 cells was almost linear up to 2 min, and apparent K_m values calculated from the Eadie-Hofstee transformation using the initial velocity of uptake at 1 min were similar to those reported for D-glucose and the non-metabolizable glucose analog, 3-O-methyl-D-glucose, found in pancreatic islets and cultured β -cells⁹.

In recent years, 2-NBDG has been shown to be useful for monitoring glucose uptake into a variety of mammalian cells.

These include pig vascular smooth muscle cells¹¹, rabbit enterocytes¹², rat cardiomyocytes¹³, rat and mouse astrocytes and neurons in culture and *in vivo*¹⁴⁻¹⁸, human and murine tumor cell lines^{19,20} and adipocyte cell lines²¹. Inhibition of 2-NBDG uptake by D-glucose has been confirmed using vascular smooth muscle cells¹¹ and tumor cell lines²⁰, and inhibition by cytochalasin B in rat astrocytes¹⁵.

Direct visualization of glucose uptake without using isotopes makes the 2-NBDG method quite attractive^{3,21,22}. In addition, 2-NBDG has recently been used to investigate cell type-specific uptake of glucose and intercellular communication, such as that in the CNS^{14-16,18}. Simple superfusion of 2-NBDG over cells using a flow-through system allows simultaneous monitoring of differing glucose uptake into heterogeneous cells. However, care should be taken because fluorescence intensity is an arbitrary measure. Thus, quantification requires stability of the system as well as accurate procedures. Accordingly, we focus here on the construction of a flow-through system as well as a practical protocol for measurement of 2-NBDG uptake. Also presented are procedures for combining this method with Ca²⁺ imaging by fura-2 and subsequent immunocytochemical identification of cells⁹.

The limitation in the use of 2-NBDG is related to its intracellular fate. We previously found that 2-NBDG is metabolized to a phosphorylated fluorescent derivative at the C-6 position (2-NBDG 6-phosphate) after entering into *E. coli* cells and then decomposes to a non-fluorescent derivative²³. Thus, the fluorescence intensity should reflect a dynamic equilibrium of generation and decomposition of 2-NBDG and the fluorescent metabolite. The use of 2-NBDG in the study of intracellular glucose metabolism is thus limited, and experiments must be carefully performed.

The protocols for 2-NBDG synthesis are described as well as the detailed characteristics of 2-NBDG, for researchers who may want to use a large amount of purified 2-NBDG.

MATERIALS

REAGENTS

- DMEM containing 4,500 mg l⁻¹ D-glucose (DMEM-HG) (Life Technologies, cat. no. 12800-082)
- MIN6 cells (see REAGENT SETUP)

- Ca²⁺, Mg²⁺-free (CMF) PBS (see REAGENT SETUP)
- Trypsin-EDTA (Life Technologies, cat. no. 25200-023)
- 2-NBDG (see Box 1 and Fig. 1)
- Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRB) (see REAGENT SETUP)

BOX 1 | SYNTHESIS OF 2-[N-(7-NITROBENZ-2-OXA-1,3-DIAZOL-4-YL)AMINO]-2-DEOXY-D-GLUCOSE (2-NBDG)

REAGENTS

- D-glucosamine (Sigma)
- NaHCO₃ (Kokusen Chemical)
- N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino chloride (NBD-Cl; Wako)
- Sephadex A-50 (Amersham Pharmacia)
- Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia)
- D₂O (100 atom %D; Aldrich)
- Acetonitrile (chromato-grade for thin-layer chromatography (TLC); Kokusan Chemical)
- Triethanolamine (TEA; Kokusan Chemical)
- TLC plate silica gel 60 F₂₅₄ (Merck Japan Limited)

EQUIPMENT

- Rotary evaporator (N-1000; EYELA)
- Freeze-dryer (FD-1; EYELA)
- DEAE (2-(diethylamino)ethyl-) Sephadex A-50 column and Sephadex LH-20 column (see REAGENT SETUP below)

REAGENT SETUP

DEAE Sephadex A-50 column and Sephadex LH-20 column Equilibrate DEAE Sephadex A-50 and Sephadex LH-20 with dH₂O, and fill into respective glass columns according to the standard protocols recommended by the company. The resin volume is 30 × 200 mm² (diameter times length) for DEAE Sephadex A-50 and 20 × 250 mm² (diameter times length) for Sephadex LH-20. Operate both columns according to the standard protocol of gel filtration.

PROCEDURE

1. Dissolve 0.5 g D-glucosamine in 10 ml 0.3 M NaHCO₃ solution in a 100-ml Erlenmeyer flask (solution A), and dissolve 0.5 g NBD-Cl in 20 ml methanol in a 50-ml beaker (solution B).
 2. Mix solutions A (10 ml) and B (20 ml) in a 100-ml recovery flask (egg plant flask). Send N₂ gas into the flask to purge the inside air and finally seal the flask with a silicon rubber cork with a balloon filled with N₂ gas. Wrap the flask with aluminum foil to shield from light. Shake the flask in a water bath shaker at 30 °C for 18 h.
 3. Remove precipitates in the reaction mixture by filtration through a nylon mesh (10 μm) (or glass wool) using an aspirator. Collect the filtrate in another recovery flask.
 4. Evaporate the reaction mixture to remove the solvent. A slight amount of solvent remaining does not matter.
 5. Add 10 ml dH₂O to the flask to dissolve the product (solution C).
 6. Load solution C on the Sephadex A-50 column after filtration through a filter paper. Elute the column with dH₂O and collect yellow and orange fractions together. It is advisable to collect small fractions and then combine them after TLC (Step 7).
 7. Frequently analyze the elute by TLC around the beginning and the end of the elution of yellow and orange components. This is done by performing these steps: (i) Spot 100-μl aliquots on the silica gel plate and develop with a solvent composed of CH₃CN:H₂O = 17:3 (v/v). (ii) Detect fluorescent spots under a UV illuminator. (iii) Heat the plate to visualize sugar spots. (iv) Determine the retention factors (R_f) of fluorescent spots and sugar spots. A typical result is shown in **Figure 1a**. R_f of 2NBDG is 0.68.
- Note:* Maximize the 2NBDG yield but minimize the collection volume to be treated in the next step. Typically, the collection volume is approximately 200 ml (solution D).
8. Reduce the volume of solution D to about 5 ml by evaporation. Observe the solution volume carefully and stop evaporation before the volume becomes too small (this is solution E).
 9. Load solution E on the Sephadex LH-20 column. Elute the column with dH₂O. Yellow, orange and brown fractions follow in that order. Collect the orange fractions.
 10. Frequently analyze the eluate by HPLC around the beginning and the end of elution of the orange component. This is done by following these steps: (i) Inject 2–5-μl aliquots into the sample injection port and elute with solvent composed of CH₃CN:H₂O = 17:3 (v/v). (ii) Adjust the elution speed to 0.5 ml min⁻¹ and monitor the optical density of the eluate at 475 nm. A typical result is shown in **Figure 1b**. The peaks at 10.5 min (P₁) and 11.8 min (P₂) represent the β-D-anomer and α-D-anomer of 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG), respectively. (iii) Estimate the purity using the formula (P₁ area + P₂ area)/(All peaks) × 100%.
- Note:* This is done to find the optimal condition to collect a maximum amount of 2-NBDG with highest purity. Successful gel filtration gives more than 98% purity.
11. Collect fractions containing 2-NBDG of more than 98% purity (solution F). Expected volume is 5 ml per fraction × 15–20 fractions.
- Note:* In case of low purity, repeat gel filtration using a fresh Sephadex LH-20 column.
12. Reduce the volume of solution F to approximately 10 ml by evaporation (solution G).
 13. Freeze solution G in liquid N₂ to lyophilize the product. A yield of approximately 100 mg is expected.
- Note:* Dissolve the dry matter with dH₂O and store at 4 °C and use within 4 weeks. Keep the dry matter at –20 °C for longer storage.
14. Confirm the identity of the product by proton nuclear magnetic resonance analysis (¹H-NMR). Dissolve the dry matter of the product with deuterium oxide and immediately analyze it using ¹H-NMR under 500 MHz. A typical result is shown in **Figure 1c**. Assign peaks to respective protons of pyranose and NBD.