

2009/2038B

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～21年度 総合研究報告書

研究代表者 森田将史

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総合研究報告		
平成19年度総括研究報告書		
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		
平成19年度分担研究報告書		
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	-----	5
犬伏俊郎		
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		
平成20年度総括研究報告書		
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	-----	11
森田将史		
平成20年度分担研究報告書		
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	-----	15
小松直樹		
平成21年度総括研究報告書		
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	-----	18
森田将史		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	26

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ガンイオン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⁺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 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。

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

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

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、フォ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

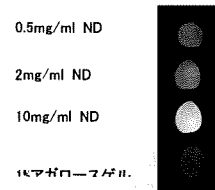


図1. 0.5%アガロースゲル、2mg/mlのマンガンイオン注入したNDを含んだ0.5%アガロースゲル、および2mg/mlのNDを含んだ0.5%アガロースゲルでのT₁強調画像の比較

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ると考えられ、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))。

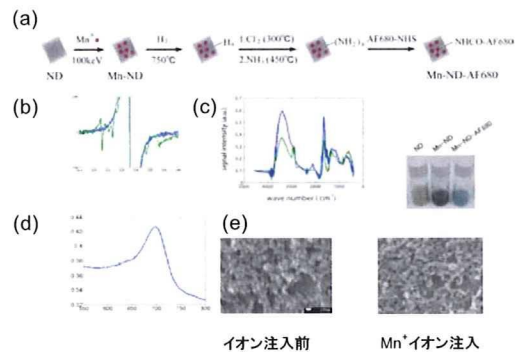


図2. (a) マンガンイオン注入法による磁性ナノダイヤモンド(Mn-ND)の創製とアミノ化表面修飾による蛍光色素(AF680)の合成方法とその合成後の写真 (b) ESRによる注入イオンの確認 (c) 表面修飾前後のIRスペクトラム (d) 蛍光色素付加後の吸収スペクトル (e) イオン注入前後のSEM画像

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なおよ、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ジュ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の種類の設定と、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める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

高温高圧法で合成されたナノダイヤモンド(ND) (トーマイダイヤ) 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: $Mt=M_0(1-2\exp(-TI/T_1))$

T_2 値測定: $Mt=M_0(2^{-TE/T_2})$

Mt: 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イオンによる 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。

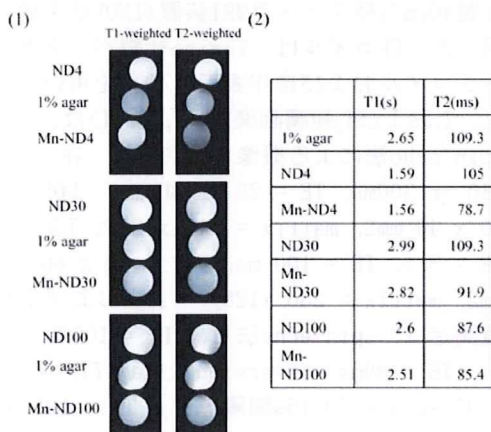


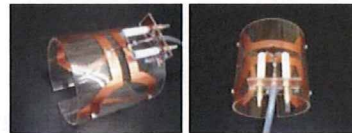
図1. (1) ND4, ND30, ND100のMnイオンを注したND、1%アガロースゲル、原材料のNDの T_1 および T_2 強調画像 (2) ND4, ND30, ND100のMnイオンを注したND、1%アガロースゲル、原材料のNDの T_1 および T_2 値

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

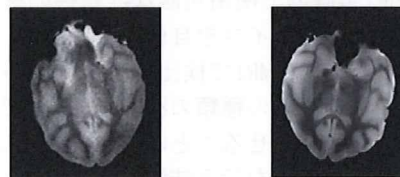


図2. (1)自作RFコイル (2)Varian社と今回自作したRFコイルを用いて撮像したサル摘出脳のspin-echo画像

D. 考察

NDの合成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、高温高圧法で合成さ

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

高温高圧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

原料の酸化的な終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°C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、そのアセトキシル化と加水分解によるヒドロキシル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、カルボキシル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、バス型超音波破砕器で、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))。

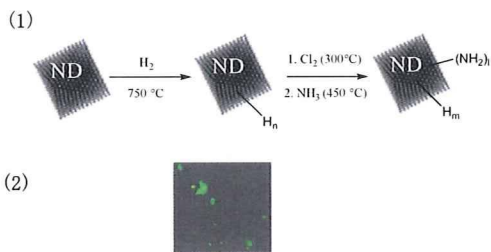


図1. (1) 爆発法で作成したND4原材料から、H₂を750℃で反応させ、水酸化した後、塩素、アンモニアを高温で反応させ、アミノ化するまでの過程 (2) (1) アミノ基を介してFITCを付与させたNDの蛍光画像

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)。

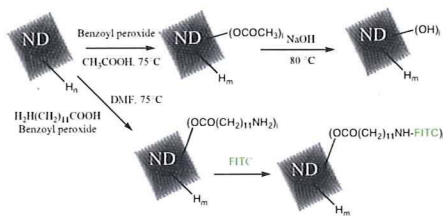


図2. アセトキシ化、ヒドロキシル化ナノダイヤモンドの合成と蛍光部位の付与

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。

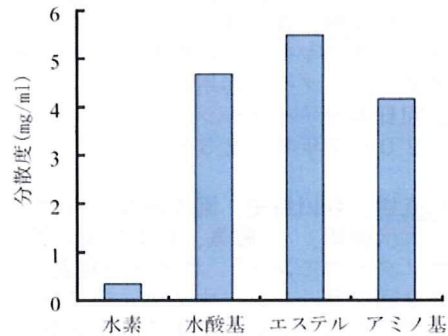


図3. 分散性への表面官能基の影響
原材料の水素化末端、エステル化末端、アミノ化末端の比較した。

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の合成方法が通常の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

- ・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

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⁺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T₁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T₂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T₂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⁺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。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)。

3. 軟X線分光実験

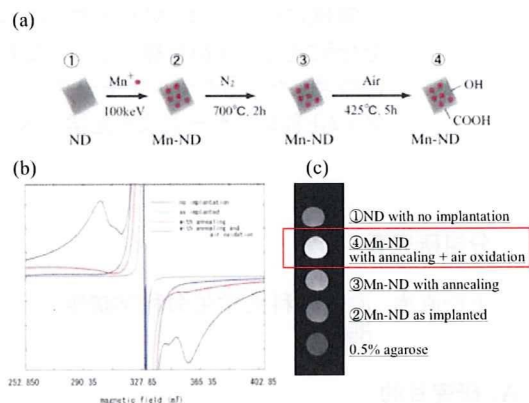
イオン注入後のND内部でのMnイオンの電子状態を調べるために、L殻励起吸収スペクトルを取得し、注入後の処理条件の検討、および処理後の2価のMnイオンの割合を探ることを目的とした。入射光に水平な面内に光電子分析器と軟X線分光器を配置する。光電子分析器は、Au4fを用いた入射光エネルギー補正、及び高次光補正用に用いる。試料面への入射角は斜入射70°に固定する。軟X線分光器のエネルギー軸及び分解能調整にはSiO₂鏡面の乱反射スペクトルを用いる。試料には、 $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ のMnイオンを注入した4nmのナノダイヤモンドND(Mn-ND as impla.)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(Mn-ND with anneal + air oxidation)を用いた。サンプルは、10mm²

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線分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T₁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T₁強調画像で比較したところ、アニールと空気酸化の両方処理したMn-NDのT₁短縮能が大きいことが分かった。



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T₁強調MRI画像 アニールと空気参加したMn-ND(□)が最もT₁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°C、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。

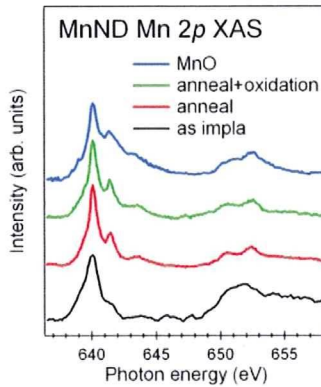


図: SPring-8で取得したMn2p吸収スペクトル(XAS)

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伝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T₁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、T₁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-Ariga 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 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 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、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 $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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、元素分析により水基に制御されたことがわかる。

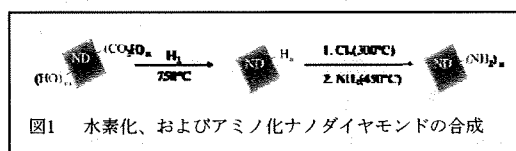
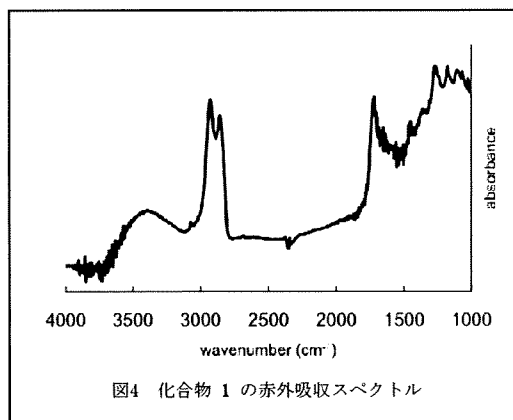
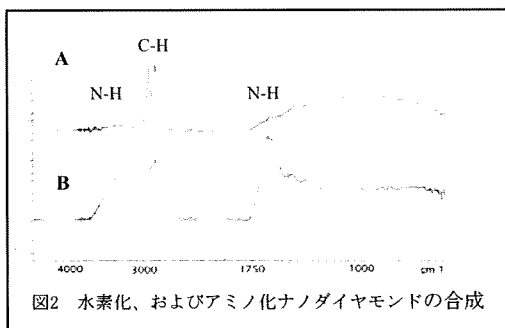


図1 水素化、およびアミノ化ナノダイヤモンドの合成

表1 官能基化ナノダイヤモンドの元素分析

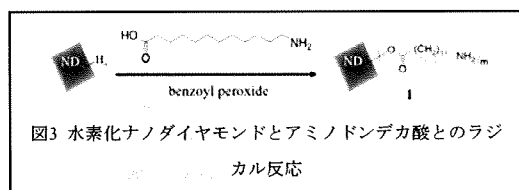
Functional group	C (%)	H (%)	N(%)	O (%)
-OH, -CO ₂ H	87.58	0.74	0.40	10.25
-H	98.53	0.77	0	0
-NH ₂	96.79	0.79	0.80	-
-OCOCH ₃	97.05	0.95	0	1.72
-OH	93.20	1.21	0	1.33
-O ₂ C(CH ₂) ₁₁ NH ₂	96.80	1.47	0.20	1.03

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



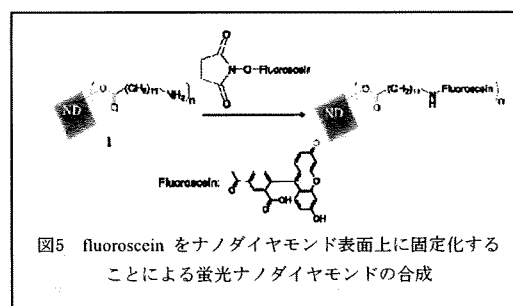
2. ナノダイヤモンド表面への蛍光体の付与

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。



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)。先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 cm^{-1} 付近のN-H、あるいは、 1700 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。

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 1 3 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。



(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)

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、以下の4つの成果を得た。①単一Mn⁺イオン注入により、磁場と光に应答するダイヤモンド造影剤(Mn-ND)の合成に成功した。②この造影剤をさらに、金ナノ粒子を介して、PEG付加することで生体環境下での分散性を付与することに成功した。③Mn-NDをマウス背足部に注入し、膝下リンパ節の可視化を行ったところ、1週間後でもリンパ節の可視化に成功し、初期炎症に特徴的なリンパ節の膨張現象が確認できた。④フェムト秒レーザーによる二光子内視鏡とMRIの融合デバイスのプロトタイプを作成を行った。

分担協力者

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(Super paramagnetic iron oxide; SPIO)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。SPIOは、その高いT₂短縮能により、少数の細胞集団のラベリングに利用されてきているが、臨床機として普及し始めた3T以上の高磁場での長期細胞トラッキングでは

懸念される問題もある。たとえば、①長時間細胞内環境下にさらされることで、SPIOの周りを覆っているデンドリマーやデキストランが分解されてしまい細胞死を起こした細胞も可視化されてしまう。その結果、T₂短縮効果を示した領域が、必ずしも生理的に機能しているとか限らず、正確な生理状態を判断できない。②iPS細胞から分化させた治療用細胞のトラッキングの追跡を行う場合、標的部位での生理機能を探りたくても、SPIO中に含まれる大量の鉄分子のT₂ブロードニング効果により、MRSでの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、メタボミクスの解析ができなくなってしまう。③詳細な形態評価を行いたくても、蛍光画像ほどの解像度がないためできない、といった問題である。

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。