

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13284

研究課題名(和文)一酸化窒素の磁気リモート制御放出

研究課題名(英文)Magnetically controlled nitric oxide release

研究代表者

山本 真平(Yamamoto, Shinpei)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・磁性粉末冶金研究センター・主任研究員

研究者番号：20362395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、非侵襲的に生体透過能の優れる磁場の特長を活かした全く新しい一酸化窒素(NO)制御放出技術として、熱分解してNOを放出する化合物と磁性ナノ粒子を均一に複合化・適度な大きさとしたナノ複合体から、外部磁場をトリガーとしてNOを放出させる技術の開発をめざした。NO放出化合物のスクリーニング、溶媒蒸発法を用いたナノ複合体合成、NO制御放出実験、および細胞毒性評価試験を行うことにより、交番磁場の印加時のみにNOを放出する低細胞毒性なNO放出ナノ複合体の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Nitric oxide (NO) is a major signalling molecule in neural, circulatory and immune systems. The biological effects of NO have been shown to be highly site, concentration and dosage dependent. This project aims to develop a system which enables controlled release of NO by an external magnetic field, to which tissues are almost transparent.

研究分野：ナノ磁性体科学

キーワード：一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素(NO)は多くの生体システムの制御に重要な役割を果たす生理活性物質として認知されているが、その反面、作用させるタイミングや暴露量を誤れば重大な副作用をもたらす有毒ガスとしても知られている[1]。いわば「諸刃の剣」ともいえるNOの医科学的な利活用には、「必要な時」に「必要な分量」だけNOを作用させる、制御放出技術の確立が必要となる。本研究の目的は、NOが実際に作用している生体、特に深部領域で、「必要な時」に「必要な分量」だけNOを放出させるシステムの基盤をなす技術を確認することである。

光をトリガーとして用い、機能性分子を「必要な時」に「必要な分量」だけ放出させる光ケージ化合物は極めて有効な手法であり、光ケージ化合物によるNOの制御放出も既に報告されている[2]。しかしながら、光の生体組織への侵入長は最大でも数cm程度であるため、NOが実際に作用している生体の深部領域で光ケージ化合物を用いることは極めて難しい。

核磁気共鳴画像診断により生体深部の情報が容易に得られることから分かるように、磁場は極めて高い生体透過能を有する。本研究はこの点に着目し、従来の光トリガー技術の高性能化ではなく、非侵襲的に生体透過能の優れる磁場の長所を活かした全く新しいNO制御放出技術の開発をめざす。上述したように、磁場には生体透過性に優れる長所があるが、このことは有機分子との相互作用が皆無に近いという短所と表裏一体である。そのため、磁場をトリガーとして用いるには、磁場の持つエネルギーをより使いやすい状態に変換せねばならない。その有効な手段のひとつとして、交番磁場下で磁性ナノ粒子が発熱する現象[3]を利用して磁場のエネルギーを熱エネルギーに変換することが挙げられる。本研究では、交番磁場下における磁性ナノ粒子の発熱を利用してNOを放出するナノ複合体(図1)を創製することを目指す。

2. 研究の目的

交番磁場下におかれた磁性ナノ粒子が発熱する現象自体は古来より知られているが、その熱エネルギーをトリガーとして用いることにより生体内で化学反応を行わせる研究例はこれまでにない。その最大の原因は、ナノ粒子は非常に大きな比表面積を有するため、発熱したナノ粒子から周辺への熱散逸が極めて大きくなる点にある。そのため、周辺組織の加熱損傷を引き起こすことなくナノ粒子だけを加熱することは極めて難しい。本研究では、熱分解してNOを放出する化合物と磁性ナノ粒子を均一に複合化・適度な大きさとしたナノ複合体という独創的なマテリアルデザインにより、この問題の解決を試みる。ナノ複合体においてはNO放出に必要

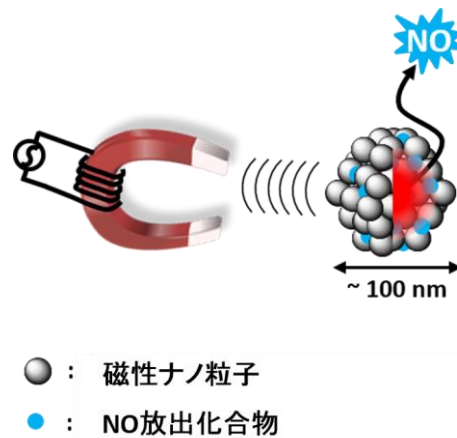


図1. 交番磁場照射によりNOを放出するナノ複合体の概念図。交番磁場下で発熱する磁性ナノ粒子と熱分解してNOを放出する化合物を均一に複合化・適度な大きさとした凝集体である。

な熱分解反応を行う高温領域を複合体内部のみに限定することで、周囲への熱散逸の低減をはかる(図1参照)。また、発生したNOはガス状態にあるため、複合体外部へ容易に拡散すると期待される。

3. 研究の方法

ナノ複合体を構成要素である磁性ナノ粒子は平均粒径22nmの Fe_3O_4 ナノ粒子を用いた。ステアリン酸鉄(III)の熱分解反応をオレイン酸の共存下、トリ-n-オクチルアミン溶液中で行うことにより合成した。具体的には、300mlの三ツロフラスコに、ステアリン酸鉄(III)(14.4g)、オレイン酸(2.4g)およびトリ-n-オクチルアミン(64.5g)を加え、 380°C で30分間反応させることにより合成した。反応溶液を室温まで冷却した後に生成した Fe_3O_4 ナノ粒子を遠心分離により精製・回収した。

Fe_3O_4 ナノ粒子および熱分解してNOを放出する化合物(NO放出化合物)から構成されるナノ複合体(図1参照)は溶媒蒸発法を用いて合成した[4]。水、界面活性剤、および所定濃度の Fe_3O_4 ナノ粒子およびNO放出化合物を含むクロロホルム溶液から構成されるマイクロエマルジョンを作製・クロロホルムを完全に蒸発させることにより、ナノ複合体を含む水分散液を得た。得られたナノ複合体は磁気分離と水による洗浄を2回繰り返して精製した。

NO放出化合物の熱分解実験は質量分析装置が附属した熱重量分析装置(TG-DTA2000SA/MS9610, ブルカーAXS)により行った。透過型電子顕微鏡(TEM)観察はJEM-1400(JEOL)により行った。TEM試料は、ナノ粒子分散液をカーボン被膜で被覆されたCuグリッドに滴下することにより調製した。

ナノ複合体からのNO放出実験は、交番磁場

装置(5005, 第一高周波)を用いて交番磁場(330 G, 100 kHz)をナノ複合体分散水溶液に印加することにより行った。また、交番磁場印加時におけるナノ複合体分散水溶液の温度は、ガラスファイバー温度計(FL-2000, 安立計器)を用いて測定した。なお、交番磁場の印加に際しては、ナノ複合体分散水溶液の温度を NO 放出化合物の熱分解が無視できる 40°C未満に保った。このことにより、交番磁場下で発熱した Fe₃O₄ ナノ粒子が遊離させた NO のみを評価することができる。

NO 放出化合物から放出された NO 量は、ナノ複合体の分散媒である水に溶解した NO 濃度から評価した。交番磁場印加終了後すぐにナノ複合体分散水溶液を遠心分離して上清を回収した。続いて、NO 指示薬(DAF-2)を含む PBS 緩衝溶液で上清を希釈することにより測定溶液を調整した。波長 490nm における発光強度は、マイクロプレートリーダー(Fluoroskan Asent FL, サーモフィッシャー)を用いて測定した。測定溶液中の NO 濃度は別途測定しておいた発光強度-NO 濃度検量線を用いて見積もった。

ナノ複合体の細胞毒性は、T24, H460 および CHO 細胞に対して、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ)を用いて、アデノシン 3 リン酸(ATP)測定法[5]により行った。96 ウェルプレートに細胞密度が 1 X 10⁴ 個となるように播種・1 日間培養した後に、所定濃度のナノ複合体分散液をウェルに添加した。その後 1 日培養し 100 μl の試薬を直接ウェルに添加した。更に 37°Cで 15 分間培養した後に、マイクロプレートリーダー(Fluoroskan Asent FL, サーモフィッシャー)を用いて波長 490nm における発光強度を測定した。すべての実験は 3 回繰り返し行った。細胞中の ATP 濃度は、別途測定しておいた発光強度-ATP 濃度検量線を用いて見積もった。細胞生存率(%)はナノ複合体を加えていないウェルの発光強度を 100%として計算した。

4. 研究成果

交番磁場下での Fe₃O₄ ナノ粒子の発熱を利用して、NO 放出ナノ複合体から NO を遊離させるためには、適切な分解温度を有する NO 放出化合物の選択が鍵となる。特に、NO が実際に作用している生体深部で「必要な時」に「必要な分量」だけ NO を放出させるためには、交番磁場が印加されたときのみ NO を遊離するナノ複合体が必要である。そのためには、人体の通常体温程度の温度領域(40°C以下程度)では NO 放出、すなわち熱分解反応はほとんど起こらないことが必要である。その一方で、周辺組織の加熱損傷を起こすことなく NO 放出化合物を熱分解させるためには NO 放出化合物の熱分解温度はあまり高くはならない。質量分析装置が付属した熱重量分析装置を持ちいて、様々な NO 放出化合物の NO 放出特性を評価した結果、

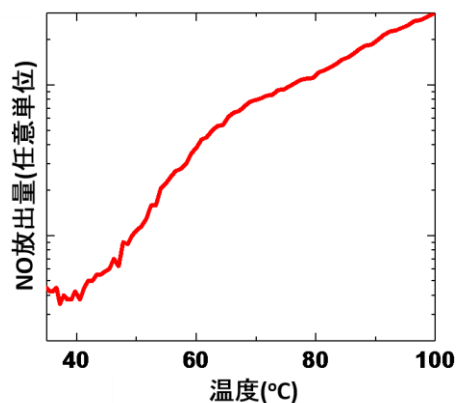


図 2. 昇温過程における NO 放出化合物の NO 放出プロファイル。40°C以上の温度領域でのみ NO が放出されていることが分かる。

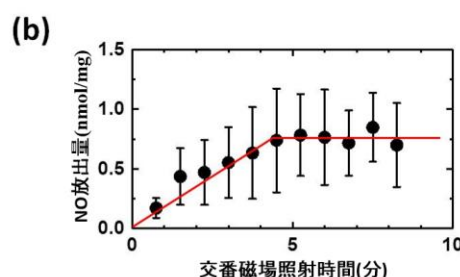
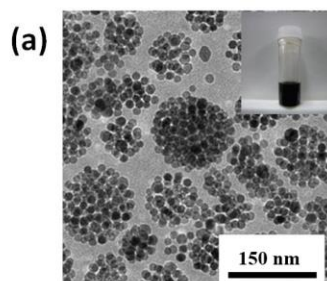


図 3. (a) 溶媒蒸発法により合成されたナノ複合体の TEM 像。挿入図はナノ複合体の水分散液。(b)外部磁場の総印加時間と NO 総発生量の関係。

40°C以上でのみ NO を放出する化合物を見いだすことに成功した(図 2)。

続いて、NO 放出化合物と Fe₃O₄ ナノ粒子を均一に複合化し、適度な大きさのナノ複合体を形成させることにより、周囲への熱散逸を低減しつつ、内部の高温度領域のみから NO を放出させる事を目指した(図 1 参照)。Fe₃O₄ ナノ粒子および NO 放出化合物の分率等のナノ複合体作製条件、および交流磁場印加条件を様々に変化させて行うことにより、

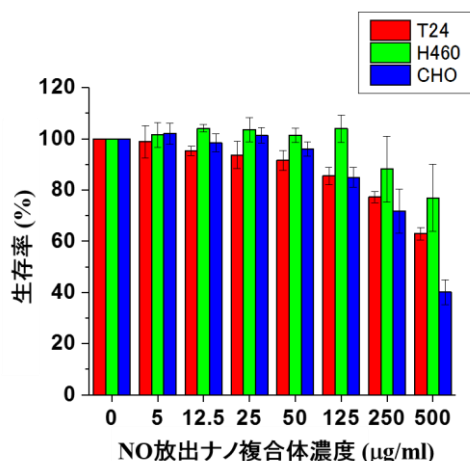


図 4. NO 放出ナノ複合体の細胞毒性試験

外部磁場印加時のみに NO を放出するナノ複合体を実現することに成功した(図 3)。得られたナノ複合体は大きさが 100~150 nm 程度の比較的均一な形状を有しており、水溶液に安定分散する(図 3(a)挿入図)。また、ナノ複合体が放出可能な NO 量は 0.75 nmol/mg 程度であり、交番磁場による NO の放出速度は 0.13 nmol/mg・分程度であることが分かった(図 3(b))。

ナノ複合体の細胞毒性を、T24、H460 および CHO 細胞を用いて評価した(図 4)。いずれの細胞種に対しても、50µg/ml 程度の比較的高濃度な領域まで細胞の生存率は高く、ナノ複合体の細胞毒性が低いことが確認された。

NO 放出化合物のスクリーニング、溶媒蒸発法を用いたナノ複合体合成、NO 制御放出実験、および細胞毒性評価試験を行うことにより、毒性細胞毒性かつ交番磁場の印加時のみに NO を放出する NO 放出ナノ複合体の合成に成功した。これまで、「必要な時」に「必要な分量」だけ NO を供給できないことが様々な疾患・障害治療への問題となっていた。外部磁場を用いた NO の制御放出技術の確立は、磁場の高い生体透過性と相まって NO が実際に作用している生体深部での制御放出実現に向けた画期的なブレイクスルーとなりうる可能性を秘めている。生活習慣病や虚血・再灌流障害に代表される既存の NO 供与体では対処できない疾患治療に向けた重要なマイルストーンになると期待される。

本技術では外部刺激として磁場を用いているが、NO を実際に放出させるのはナノ複合体が持つ熱エネルギーである。金ナノ粒子や磁性ナノ粒子を用いた温熱療法に代表されるように、これまでナノ粒子の持つ熱エネルギーは周辺組織を加熱する目的で使用されることが一般的であり、周辺に影響を与えないトリガーとして用いられることは無かった。しかし、周辺への熱散逸を効果的に抑

制するナノ複合体という独創的なマテリアルデザインがその状況を一変させる考えられる。比較的低温度で開裂する化学結合様式は多く存在しており、NO 以外の薬物・生理活性物質への展開・発展も期待できよう。

<引用文献>

1. 例えば、C. Bogdan, *Nature Immunology*, **2001**, 2, 907.
2. S. Sortino, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 2903.
3. Q.A. Punkhurst, N. T. K. Thanh, S. K. Jones and J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2009**, 42, 224001.
4. Z. Lu and Y. Yin, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 6874.
5. S. P. M. Crouch, R. Kozlowski, K. J. Slater and J. Fletcher, *J. Immunol. Methods*, **1995**, 160, 81.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山本真平、「水素化カルシウムを用いた磁性金属ナノ材料の低温合成」、粉体粉末冶金協会平成 28 年度春季大会、2016 年 5 月 26 日、京都工芸繊維大学(京都府)
- ② 山本真平、「CaH₂還元による SiO₂被覆 FeCo 合金ナノ粒子合成」、第 40 回日本磁気学会学術講演会、2016 年 9 月 6 日、金沢大学(石川県)
- ③ 山本真平、「シリカ被覆 FeCo 合金ナノ粒子の低温合成」、粉体粉末冶金協会平成 28 年度秋季大会、2016 年 11 月 9 日、東北大学(宮城県)
- ④ 山本真平、「Stabilities of ferromagnetic iron nitride, α'-Fe₁₆N₂」、第 26 回日本 MRS 年次大会、2016 年 12 月 20 日、横浜市開港記念館(神奈川県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：磁性材料とその製造法
 発明者：山本真平、今岡伸嘉、松本章宏、尾崎公洋
 権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所
 種類：特許
 番号：特願 2017-033327
 出願年月日：2017 年 2 月 24 日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 真平 (YAMAMOTO, Shinpei)
産業技術総合研究所・磁性粉末冶金研究センター・主任研究員
研究者番号：20362395

(2)研究分担者

マクナミー キャシー (McNamee, Cathy)
信州大学・繊維学部・准教授
研究者番号：40504551