

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05208

研究課題名（和文）ナノ粒子型MRI造影剤におけるプロトン緩和機構の解明と深化

研究課題名（英文）Elucidation of proton relaxation mechanisms on nanoparticulate MRI contrast agents

研究代表者

木村 祐 (Kimura, Yu)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90566027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ガドリニウム（Gd）は高い常磁性を有し水プロトンの縦緩和時間（T1）短縮効果が高いため磁気共鳴撮像法（MRI）でのコントラストを増強できる。臨床使用されるキレート型Gd-MRI造影剤は高濃度投与による毒性発現が懸念されており、投与量低減のためより高いT1短縮効果を持つ造影剤の開発が必要である。本研究では、新たに開発した新規ナノ粒子型Gd-MRI造影剤におけるT1短縮機構を明らかにするため、核磁気共鳴（NMR）測定によりナノ粒子と水分子との相互作用を解析した。その結果、水分子と造影剤の相互作用を直接観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ナノ粒子の粒径の増加に伴い水分子1Hの縦緩和時間短縮効果能が高くなることを示すとともに、表面修飾剤の効果によって、¹⁷⁰NMR測定においてGdと水分子の相互作用を観測できること、濃度・粒径依存性から、通常のナノ粒子型Gd-MRI造影剤と同様の表面積効果を有することを明らかにした。また、バルク水¹⁷⁰核横緩和速度の温度依存性から、粒径25-160nmにおいてGdに配位した水とバルク水との交換が比較的速いことが示唆された。本結果は、ナノ粒子型Gd-MRI造影剤のさらなる高感度化を実現するための指針となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Gadolinium has high paramagnetic properties and is highly effective in shortening the longitudinal relaxation time (T1) of water protons, thus enhancing the contrast of MRI. Generally used chelated Gd-MRI contrast agents might be toxic when administered at high concentrations, and it is necessary to develop a contrast agent with higher T1 shortening effect to reduce the dose. In this study, nuclear magnetic resonance (NMR) measurements were performed to analyze the interaction between the nanoparticles and water molecules, to clarify the T1 shortening mechanism in a novel nanoparticulate Gd-MRI contrast agent. As a result, we succeeded in directly observing the interaction between water molecules and the contrast agent.

研究分野：生体材料学，ドラッグデリバリーシステム

キーワード：造影剤 MRI ナノ粒子 ガドリニウム 磁気共鳴 イメージング

1. 研究開始当初の背景

ガドリニウム (**Gd**) は **4f** 軌道に **7** つの対電子を有し周期表上最大の磁気モーメントをもつ元素であり、水分子の **¹H** 核に対する緩和時間短縮効果が高いことから磁気共鳴撮像法 (**MRI**) において陽性造影剤として用いられている。しかしながら、**Gd³⁺** イオンは毒性が高いことから、遊離を防ぐため **DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid)** 等の配位子を用いた錯体としての使用に限られている。また、錯体型 **Gd-MRI** 造影剤における問題として近年、高用量での腎線維症等の発現や、脳組織への蓄積懸念が報告されている。これらは造影の際、高濃度 (**0.1 M** 程度) 造影剤が必要であることに起因すると考えられ、より高い緩和時間短縮効果をもつ造影剤の感度を向上することが求められている。このような高感度化造影剤の開発指針について、**Gd** 原子と水分子との配位状態に着目し、**¹H** 核の緩和速度を表すものとして **Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM)** 理論が知られており、影響する各因子の最適化を目的として、タンパク質や樹状高分子、多孔体化合物 (シリカ、炭素材料等) との複合体形成やナノ粒子状化合物の合成などが行われている。研究代表者らにおいても、**Gd** に dendrimer (樹状高分子) の中心を配位させた化合物を合成、従来にない高感度化や血管滞留性向上について報告するとともに **Gd** を含むナノ粒子の合成では、酸化ガドリニウム (**Gd₂O₃**) を含むナノ粒子型造影剤を用いた光超音波-**MR** デュアルイメージングプローブの合成について報告してきた。これらの **Gd-MRI** 造影剤について、特にナノ粒子型化合物においては水分子との配位サイト数との関連から表面積が高感度化に関して大きな役割を果たしており、数 **nm** 程度の超微細粒子を用いた高感度化について多数の報告がなされ、粒径の増大とともに陽性造影剤として必要な縦緩和時間 (**T₁**) 短縮効果が減少し陽性造影剤の効果を減弱させる横緩和時間 (**T₂**) 短縮効果が增大することが報告されている。また、近年では多孔体シリカおよび多孔体炭素材料への超微細 **Gd₂O₃** 粒子の固定化により高い **T₁** 短縮能を有する造影剤が報告され、その **T₁** 短縮効果発現機構にも注目が集まっている。しかしながら、研究代表者らが合成したナノ粒子型 **Gd-MRI** 造影剤においては粒径が **100 nm** 前後であっても臨床用造影剤 (**Gd-DTPA**) の約 **3** 倍という比較的高い **T₁** 短縮効果を保っておりその原因が不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、研究代表者らが開発したナノ粒子型 **Gd-MRI** 造影剤における **T₁** 短縮能発現機構を明らかにするために、造影剤と水分子との相互作用について詳細に解析を行い、さらなる高感度への指針を得ることを目的とした。ナノ粒子型 **Gd-MRI** 造影剤は、ポリオール法により合成した **Gd₂O₃** ナノ粒子が溶媒であるジエチレングリコール (**DEG**) を伴って形成されたものであり、水中でゆるやかに凝集するため、任意のタイミングでゼラチン水溶液を添加することで保護コロイドを形成し、二次凝集体としてサイズ調節された水分散可能なナノ粒子を形成するという特徴をもつ。上記の手法を用いて合成した種々のナノ粒子型 **Gd-MRI** 造影剤について、小動物用 **MRI** 装置を用いて **¹H** 核緩和時間短縮効果を測定するとともに、**NMR** を用いた水分子との相互作用に関する観察を行った。

3. 研究の方法

(1) ゼラチン被覆 **Gd₂O₃** ナノ粒子の合成

Gd(NO₃)₃ · 6H₂O (1.0 mmol) を **DEG (1 mL)** に加え **100 °C** で加熱攪拌後 **NaOH (1.25 mmol)** と超純水を加え、**140 °C** および **175 °C** で加熱攪拌することで **Gd₂O₃** ナノ粒子を得た。アセトンによる洗浄後、超純水に分散させて濾過による粗大粒子除去を行うことで **Gd₂O₃** ナノ粒子水分散液を得た。経時的に粒径測定を実施、適当な 2 次凝集体が得られたところで豚皮由来低分子量ゼラチン (**Mw: 2,000**) 水溶液を加え、ゼラチン被覆 **Gd₂O₃** ナノ粒子を得た。

(2) 磁気共鳴撮像法 (**MRI**)

小動物用 **MRI (7.0 T)** を用い、緩和時間 **T₁**、**T₂** および **T₁**、**T₂** 強調像を、**Spin echo** 法 (**TR/TE = 200/6.2 ms**, **FOV: 6 x 6 cm²**, **Matrix: 256 x 256**, **Slice thickness = 2 mm**, **NEX2**) の条件下、室温で取得した。

(3) **NMR** 測定

400 MHz NMR 装置を用いて **4, 15, 25, 40, 50, 60 °C** に試料温度を変化させて **¹H** および **¹⁷O** **NMR** 測定を実施した。**¹⁷O NMR** では各種濃度の **Gd** を有する試料に対して **5 v/v%** **¹⁷O** を含むように **H₂¹⁷O** を添加して測定を実施した。

4. 研究成果

(1) 造影剤ナノ粒子径の経時的変化

ゼラチン被覆前の Gd_2O_3 ナノ粒子 (NP-0) およびゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子 (NP-1~3) について動的散乱測定による粒径の経時的変化を観察したところ、被覆前のナノ粒子は水中で1次関数的に粒径が増大し、ゼラチン添加後は再現性をもって粒径が安定した(図1)。また、これら造影剤ナノ粒子について $60^\circ C$ まで昇温しながら粒径測定を行ったところ大きな変化はみられず、ゼラチンの保護コロイド効果による分散安定化が確認された。

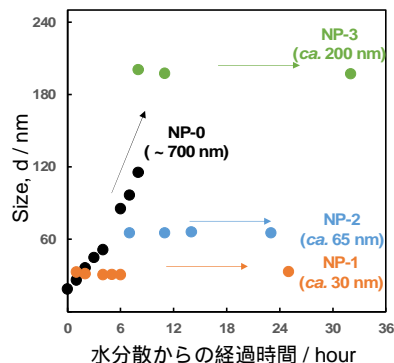


Figure 1. Time course change of mean particle size of Gd_2O_3 nanoparticles before and after addition of gelatin.

(2) MRI 撮像によるプロトン緩和能 r_1 , r_2 測定

異なる粒径を有するゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子 (NP-1~3) と $Gd-DTPA$ について、種々の濃度の水分散液を調製し、7 T 小動物実験用 MRI 装置を用い T_1 強調像を取得した。この画像より得られた $1/T_1$ および $1/T_2$ を Gd 濃度に対してプロットした直線の傾きから、 1H 緩和能 r_1 および r_2 を算出した。その結果、NP-1~3 は全て臨床用造影剤 $Gd-DTPA$ よりも高い r_1 , r_2 を示し、粒径が大きくなるほど r_1 , r_2 は上昇した。粒径が増大するとともに表面積は減少し Gd に配位する水分子数は減少すると考えられるが、粒径増大により回転相関速度 τ_R が減少したことで r_1 が上昇したと考えられる。

(3) ^{17}O -NMR 測定

5 v/v% ^{17}O を含む 30 mM NP-1 分散液について、 $25^\circ C$ における ^{17}O -NMR スペクトルを取得した。その結果、0 ppm 付近に大きなピーク、および 524 ppm 付近の小さなピークが観測された。 Gd 濃度を 5 mM、10 mM に変化させて ^{17}O -NMR 測定を行った結果、0 ppm と 524 ppm ピークの積分比が Gd 濃度に伴い変化したことから(表1)、0 ppm は Gd に配位していないバルク水のピーク、524 ppm は Gd に配位した水分子のピークと归属できた。しかしながら、同様の測定を臨床用造影剤 ($Gd-DTPA$) を用いて行ったところ 524 ppm 付近のピークは観察されなかった。このことは、 $Gd-DTPA$ においてはナノ粒子型造影剤 NP-1~3 よりも配位する水分子量が少ないことを示唆しており、表面修飾剤による効果が要因として考えられた。

Table1. Integrated intensity ratio of signals at 0 and 524 ppm in ^{17}O NMR spectra of Gd -MRI contrast agent (NP-1) dispersion.

Gd Conc. / mM	Integration ratio (524 ppm / 0 ppm)
5	trace
10	0.24×10^{-3}
30	1.31×10^{-3}

(4) 温度可変 ^{17}O -NMR 測定

5 v/v% ^{17}O を含む 30 mM NP-1 分散液について、4, 15, 25, 40, 50, $60^\circ C$ で ^{17}O -NMR 測定を実施した。その結果、 Gd と水との相互作用による常磁性シフトをバルク水のピークからも確認するとともに、温度上昇に伴って、バルク水のピークが高磁場側へシフトし先鋭化することが明らかになった。このことは、熱運動により水分子の交換が速くなったことを表している。また、濃度・粒径を変化させて同様の測定を行ったところ、濃度増大に伴いピークが高磁場側へ大きくシフトするとともに、粒子径の減少に伴い、ピークが高磁場側へわずかにシフトした(図2)。このことから、 $Gd-O$ 相互作用による常磁性シフトおよび粒子表面積の増大による効果が観察されたと考えられる。

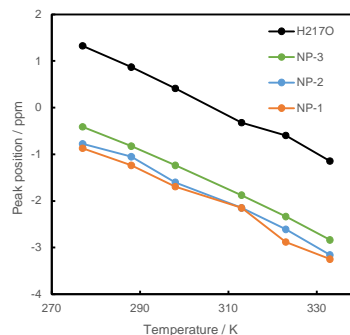


Figure 2. Temperature dependence of ^{17}O NMR peak position on NP-1~3 dispersion.

さらに、得られたバルク水ピークの半値幅をもとに ^{17}O 核の横緩和速度 R_2 を算出したところ、いずれの粒径を有するナノ粒子においても、温度上昇とともに R_2 は減少する傾向にあることが明らかになった。

^{17}O 核横緩和速度の温度依存性については、横緩和速度が温度上昇に伴い減少する系および温度上昇とともに増加する系において、水の滞留時間 τ_m と横緩和時間 T_2 の関係が報告されており、水の交換速度 $1/\tau_m$ が横緩和速度 $R_2 = 1/T_2$ よりも速い場合には温度上昇に伴い横緩和速度 R_2 は減少することが知られている。この原

因として交換速度が速い系では、温度上昇によりさらに水の交換が速くなり、**Gd** から磁氣的影響を受ける十分な滞留時間 τ_m が確保できなくなることが知られており、ゼラチン被覆 **Gd₂O₃ NP** においても比較的速い水の交換によって、**MRI** における高い縦緩和能を示すのではないかと考えられた。

以上の結果より、水分散からゼラチン添加までの経過時間を変化させることで、種々の粒径を有するゼラチン被覆 **Gd₂O₃** ナノ粒子 を合成するとともに、ナノ粒子の粒径の増加に伴い水分子 ^1H の縦緩和時間短縮効果能が高くなることを確認した。また、 ^{17}O -**NMR** 測定により **Gd** と水分子の相互作用を直接観測することに成功し、濃度・粒径依存性より、通常のナノ粒子型 **Gd-MRI** 造影剤と同様の表面積効果を有していることが明らかとなった。またバルク水 ^{17}O 核の縦緩和速度温度依存性より、粒径 **25-160 nm** において **Gd** に配位した水とバルク水との交換は比較的速いと考えられた。これらの結果は、ナノ粒子型 **Gd-MRI** 造影剤においては表面修飾剤の影響ならびに粒径が陽性造影剤としての効果に影響を及ぼすことを示唆しており、さらなる高感度化を実現するための指針となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村祐, 金田啓佑, 吉田七瀬, 三浦理紗子, 今井宏彦, 近藤輝幸
2. 発表標題 ナノ粒子型 Gd-MRI造影剤 - 水分子相互作用の NMR 観察
3. 学会等名 第16回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------