

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650216

研究課題名（和文） 分子電極による電位計測基盤の創成

研究課題名（英文） Development of molecular electrode

研究代表者

市川 和洋（ICHIKAWA KAZUHIRO）

九州大学・先端融合医療創成センター・教授

研究者番号：10271115

研究成果の概要（和文）：

本研究では、分子電極分子について細胞毒性試験を行い動物実験で想定される濃度において顕著な有害性を認めないことを明らかにした。また、電位変動に対して想定されるスペクトル位置・画像強度変化量を検出可能な計測装置の高度化を行った。そこで1) 分子電極イメージングの課題抽出、2) 本法の有効性の実証、3) 新たな分子電極分子の合成、について検討を進めた。X-band ESR を用いたスペクトルレベルの検討、オーバーハウザー効果 MRI を用いたイメージングレベルの検討の双方において、pH 6-9 程度の電位変動に応じて、分子電極分子の電子スピン共鳴スペクトルあるいはオーバーハウザー効果 MRI のイメージング画像強度が pH 依存的に変動することを実証した。さらに新規物質5種の合成と物性計測を行った。以上の成果により、電位応答性分子を分子電極として生体計測に用いる計測系を確立した。本系では計測領域に分子電極を到達させる必要が有ることから、組織・細胞内小器官送達性を高めるなどの分子合成を進めることで、さらに本法の有効性は向上するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined cytotoxicity and hazardous dose of pH responsive compounds and found these molecules are low toxic when the concentrations are lower than several mM. We also made a sensitive detecting device which allows a sophisticated analysis of the compounds which has very wide ESR linewidth and low S/N ration. With the use of X-band ESR spectroscopy or Overhauser enhanced MRI, the pH changes between 6 to 9 was analyzed in 0.1 resolutions. We also synthesized five new molecules that are sensitive to pH changes, and physical properties of the compounds were investigated. Based on the results, we are able to measure potential changes both in vitro and in vivo. Since it is necessary to deliver the molecule to region of interest, the effectiveness of the present method can be improved further by advancing the molecular design, such as increasing the tissues and organelles delivery properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：電位、磁気共鳴、非侵襲測定

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

細胞膜電位、活動電位の計測技術は、神経科学・電気生理研究においては必須かつ重要なツールの一つである。近年、生命現象解析や、疾患機序解明・薬効評価の基盤として、低・非侵襲の可視化手法が重要と考えられるようになった（NIH、NIBIB）。近年、周辺イオン濃度に依存して磁気共鳴スペクトルが変化する常磁性分子が報告された（Khrantsov, 2010）。この電位応答分子を“分子電極”として用いることが出来れば、生体における電位変動計測を通じて、神経細胞活動の低・非侵襲可視化が実現できるのではないかと考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

神経科学研究等に重要な役割を果たす膜電位、活動電位計測に新しい手法を確立し、研究ツールとして提供する。すなわち、本提案では、常磁性の電位応答分子（分子電極）を用いる、低・非侵襲の生体電位測定・可視化法の基盤創成を目指す。分子電極の概念は本研究で提案するものであり、また磁気共鳴法による電位計測は行われていない。そこで、分子電極の細胞毒性・個体毒性の検討からスタートし、試験管、組織、個体レベルの計測を行うことで、計測法確立を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 分子電極の特性解析により生体電位計測での有用性を明らかにする

まず分子電極の電位応答性について溶液レベルでの詳細解析を実現する機器を導入し、各分子が有する電位分解能の解析を行った。磁気共鳴装置内で溶液試料に対して任意の電位調整が可能な磁石対応型電極セル・電源を導入した。

2) 培養細胞、マウス個体における毒性値を明らかにする

分子電極に用いる化合物群は近年合成されたものであり、その有害性に関する文献報告は無く、細胞あるいは生物個体への投与可能量を設定する為の情報が明確でない。既・新規化合物の細胞毒性検討を行うことで、生体計測への適合性を確認するため、培養神経細胞及びマウスにおける LD₅₀ の検討を行った。

3) 培養細胞において既往法との比較解析を行い、in vitro 計測手法として確立する

1) の溶液試料における計測特性を明らか

にしたのち、培養細胞を用いた計測を行った。まず、培養細胞の脱分極を例として用い、提案法と膜透過・非透過分子電極を用いた磁気共鳴スペクトル計測により検討した。また、画像化に向けた詳細な条件検討を行うとともに、in vivo 投与・in situ/in vivo 計測における有用性の検討を行った。

4) 新たな分子電極を合成し、その有用性を明らかにする

磁気共鳴画像化においては、一般にスペクトル吸収幅が狭い方が有利であることが知られている。レドックス造影剤合成における経験から、4位側鎖の電子吸引基修飾、及び2、5位の重水素置換が狭吸収スペクトル線幅の実現に有効であることを明らかにしており、またその効率的変換技術も開発済みである（Tetrahedron, 2010）。従って、1)、3) の検討に基づいて電位分解能の詳細計測を行った。

5) 分子電極の画像化における要件解析を行うことで可視化における課題を明らかにする

既合成化合物を用いた予備的な検討では、連続的電位調整が出来なかったことから、画像化で実現しうる電位分解能は不明であった。そこで、磁石対応電位調整セル等を利用して、in vitro 試験により分解能を計測した。

4. 研究成果

1) 磁石対応型の電極セルを導入することで、リアルタイムかつ連続的に電位調整を行うことが可能となった。

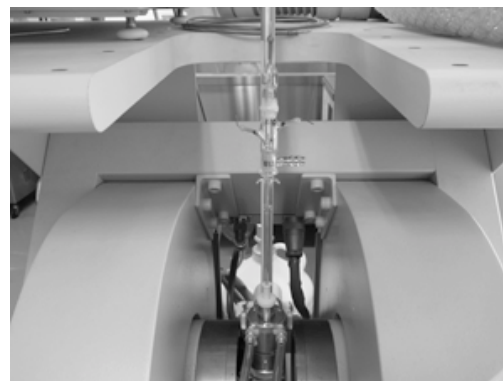


図 磁石対応型電極セルを設置した X-band ESR 測定装置

2) 生物試料への応用例が殆ど報告されていないため、培養神経細胞及びマウスにおいて、LD₅₀ の検討を行った。その結果、電子スピン

共鳴計測で汎用されている最大血中濃度 1-5mM 程度において顕著な有害性は認められなかった。従って、ことから、in vivo 計測に向けた最大投与可能量の目安が得られた。

3) 分子電極化合物は電極としての電位応答性は十分有しているものの、計測対象の物理量変化が微小であること、化合物の電子スピン共鳴スペクトル線幅が広く、相対的に感度が低い可能性が考えられた。そこで、線幅(1 Gauss程度)から推定される感度低下を補い、動物実験において有効なイメージング感度を実現するため、検出装置の改良に着手した。その結果、画像化条件において分解能 $\Delta\phi < 0.1$ を得た。その結果、分子電極法の in vitro 計測法としての基盤を確立した。

4) 3) で示した開発指針に基づき、新たな分子電極合成を行い、5 種を開発した。これらの位相転移点は pH5-8 であった。



図 合成した分子電極化合物の X-band ESR スペクトルの 1 例

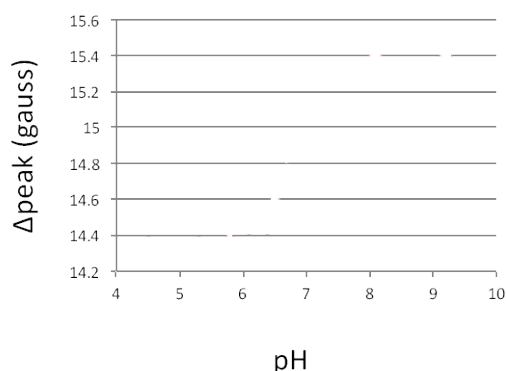


図 合成した分子電極化合物の pH 応答性の 1 例

5) X-band ESR を用いたスペクトルレベルの検討、pH 6-9 程度の電位変動に応じて、分子電極分子の電子スピン共鳴スペクトルが pH 依存的に変動することを実証した。ま

た、オーバーハウザー効果 MRI を用いた画像分解能においても同等の電位分解能を得た。本系では計測領域に分子電極を到達させる必要が有ることから、組織・細胞内小器官送達性を高めるなどの分子合成を進めることで、さらに本法の有効性は向上するものと考えられる。

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 3 件)

- (1) Kosem N, Ichikawa K, Utsumi H, Moongkarndi P. : 「In vivo toxicity and antitumor activity of mangosteen extract」, *J. Nat. Med.*, 67(2), 255-63, (2013) DOI: 10.1007/s11418-012-0673-8
- (2) Kosem N, Naganuma T, Ichikawa K, Phumala Morales N, Yasukawa K, Hyodo F, Yamada KI, Utsumi H. : 「Whole-body kinetic image of a redox probe in mice using Overhauser-enhanced MRI」, *Free Radic Biol Med.*, 53(2), 328-336, (2012) DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.026
- (3) Yamato M, Shiba T, Naganuma T, Ichikawa K, Utsumi H, Yamada KI. : 「Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging characterization of mitochondria functional changes in the 6-hydroxydopamine rat model」, *Neurochem Int.* 59(6), 804-11, (2011) DOI: 10.1016/j.neuint.2011.08.010

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 市川和洋 : 「LPS 肺炎モデルのレドックス動態解析」, 札幌, 日本薬学会第 132 年会, 平成 24 年 3 月 30 日
- (2) K. Ichikawa : 「Imaging in vivo oxidative diseases using OMRI」, Kazan, Conference of Zavoisky Award in Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy September, 25-29th Sept. 2012.
- (3) K. Ichikawa : 「Development of Overhauser enhanced MRI for imaging in vivo Physiological function」, Hokkaido University, Sapporo, The 10th International Symposium for Future Drug Discovery & Medical care, 2-3rd Oct. 2012.

〔図書〕（計 1 件）

- (1) 市川和洋: 画像診断技術, 薬学領域の機器分析(財津潔編), 広川書店 第 2 版
2013 年 4 月

〔その他〕

ホームページ等

<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/group1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川和洋 (ICHIKAWA KAZUHIRO)

九州大学・先端融合医療創成センター・教授

研究者番号 : 10271115

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし