

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510152

研究課題名(和文) 磁気共鳴法による生分解性高分子ナノ粒子プローブの徐放性評価法の開発

研究課題名(英文) Molecular Imaging of polymer nanoparticles labeled with nitroxyl radicals using Overhauser-enhanced MRI for assessment of release of drugs

研究代表者

伊藤 慎治 (SHINJI, ITO)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・学術研究員

研究者番号：30570585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：生分解性的高分子ナノ粒子の薬剤の徐放性を非侵襲的にかつリアルタイムに評価できる方法を開発するため、本研究では、磁気共鳴法の一つであるオーバーハウザー効果MRI(OMRI)によって、生体に投与された高分子ナノ粒子の動態を高解像度で画像化する検討を行った。高分子ナノ粒子をニトロキシラジカルでスピンラベルして高分子ナノ粒子プローブを作製し、その疑似試料をOMRIによって画像化した。その画像強度は12時間にわたり増大した。また、実験動物の胃内に投与してOMRIによって画像化したところ、フリーのニトロキシラジカルとは異なる経時変化を示した。

研究成果の概要(英文)：To obtain non-invasive and real-time information on release of drugs for biodegradable polymer nanoparticles, the aim of this study is development of method to visualize the polymer nanoparticles administrated in a living body and to follow their changes by Overhauser enhanced magnetic resonance imaging (OMRI). We obtained OMRI images of polymer nanoparticles labeled with nitroxyl radicals, as a phantom sample or orally administrated sample in stomach of a mouse. Image intensities of the OMRI images for the phantom sample increased for 12 hours after preparation. The changes in image intensities of the OMRI with times for the orally administrated sample were different from those for orally administrated free nitroxyl radicals.

研究分野：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：PVM/MA ニトロキシラジカル Tempamine OMRI 画像化

1. 研究開始当初の背景

生分解性の高分子よりなるナノ粒子を薬物の徐放基材として利用する期待が高まっている。生体内に投与された高分子ナノ粒子の薬物徐放性を評価するためには、生体内での分布状態や濃度、その動態を画像化しながら無侵襲的にかつリアルタイムに調べる方法が必要となってくる。その解決方法として、高分子ナノ粒子に蛍光物質を付与して、分光学的に画像化する方法が挙げられるが、光本来の非生体透過性のために、生体内深部での画像化には適用が困難である。そこで、高分子ナノ粒子をニトロキシラジカルでスピンラベルして高分子ナノ粒子プローブを作製し、磁気共鳴法により画像化する方法が提唱されている。磁気共鳴法による画像化では、試験体を磁場中に置き、生体透過性の高い低周波数帯域の励起パルス照射することでラジカルを画像化できるため、生体深部まで容易に高分子ナノ粒子プローブを画像化することが可能となる。また、ニトロキシラジカルは安定なラジカル体であるため、高分子ナノ粒子が分布する生体内での動態を長時間にわたって非侵襲的にかつリアルタイムに調べることができる。こうした磁気共鳴法によるニトロキシラジカルの画像法として、電子スピン共鳴法(ESR)に基づいた画像法が挙げられる。しかし、電子スピン共鳴画像法ではラジカルのみが特異的に画像化され、解剖学的位置情報が得られないことから、X線画像法(CT)や核磁気共鳴画像法(MRI)などを併用するにしても、高分子ナノ粒子プローブの動態変化をリアルタイムに評価することは難しい問題があった。

2. 研究の目的

磁気共鳴法の一つであるオーバーハウザー効果MRI(OMRI)は、ラジカル物質を高解像度で画像化が可能な方法で、生体内のラジカルを非侵襲的にかつリアルタイムに画像化

できる利点を有する。ニトロキシラジカルを実験動物に投与して、そのラジカル動態をOMRIで画像化した研究が多数報告されている(ex. Kosem *et al.*, 2012)。本研究では、ニトロキシラジカルでスピンラベルした高分子によりナノ粒子を作製し、これを生体に投与したときの高分子ナノ粒子の分布状態や濃度、その動態をOMRIによって評価できる方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

Poly(methyl vinyl ether maleic anhydride)(PVM/MA)は、生分解性の高分子として知られ、そのナノ粒子は粘膜に対する付着性に優れることが報告されている(ex. Arbos *et al.*, 2003)。こうした高分子ナノ粒子を用いれば、生体の目的部位へのナノ粒子の集積性を高め、薬物放出の量や効率を高めることが期待され、例えば胃や腸などの粘膜を通じた薬物の徐放性が期待できる(Irache *et al.*, 2005)。K. Maeder (Martin-Luther University, ドイツ)らは、PVM/MAと、ニトロキシラジカル的一种であるTempamineとをアセトンに溶解し、この溶解液と水を混合した後にアセトンを蒸発除去することにより、PVM/MAにTempamineを結合させてPVM/MA-Tempamine(PVM/MA-TA)のナノ粒子を作製し、そのESR測定などを行っている(未発表)。本研究では、この方法に基づいてPVM/MA-TAのナノ粒子プローブ液を調製し、この疑似試料をOMRIにより画像化した。このOMRI画像の経時変化を調べ、ESRスペクトルの経時変化と比較した。

また、PVM/MA-TAのナノ粒子液を実験動物の胃内に投与した時にOMRIにより画像化し、そのOMRI画像の経時変化を調べた。これを、フリーのTempamine水溶液を投与した時のOMRI画像の画像強度の経時変化と比較した。これらの結果から、PVM/MA-TAナノ粒子の生体内での動態を評価した。

4. 研究成果

Poly(methyl vinyl ether-alt maleic anhydride) 粉末(Sigma、平均 Mw~216,000 Mn~80,000)と、Tempamine (4-amino-2,2,6,6-tetramethyl piperidine 1-Oxyl Free radical)粉末(Tokyo chemical industry)とを購入し、Maederらと同様の方法でPVM/MA-TA ナノ粒子プローブ液を調製した。さらに、限外濾過法により未反応物質を除去して濃縮した後に、水で希釈して、ラジカル濃度を2~4 mM (ESR スペクトル測定に基づく値)に調整した。サンプル調整して2-3 時間後に動的光散乱法により測定した時の平均粒径は150-170 nmであった。調製直後のpHの値は3.6であった。このPVM/MA-TA ナノ粒子液(ラジカル濃度 2 mM)について、X-Band ESR スペクトルの測定を12 時間にわたり 1 時間毎に行った。調製直後のPVM/MA-TA ナノ粒子液のESR スペクトルと、その積分形のピーク高さの経時変化を図1に示した。PVM/MA-TA ナノ粒子液のピーク高さについては、12 時間で1.2 倍になった。なお、ピーク線幅は12 時間にわたり、ほぼ一定であった。

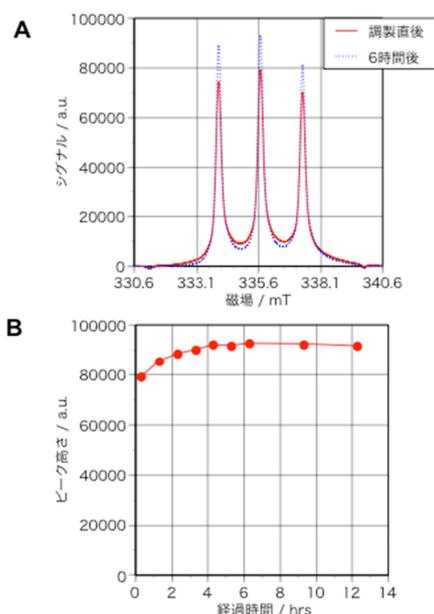


図1 PVM/MA-TAナノ粒子液のESRスペクトル測定結果
A: サンプル調製直後と6時間後に測定されたESRスペクトル(積分形)、B: 中央ピークの高さの経時変化

この PVM/MA-TA ナノ粒子液(ラジカル濃度 2 mM)の疑似試料を用意し、OMRI の撮像を12 時間にわたり 1 時間毎に行った。ここでは単一磁石型の低磁場(0.02 テスラ)OMRI 装置(Keller, Japan Redox Limited)を用いた。得られた画像と、その画像強度の経時変化を図2に示した。調製直後の画像強度のレベルは低かったが、12 時間の時間経過により画像強度の増大が見られ、12 時間後には調製直後の2.4 倍になった。この画像強度は、0.5 mM Tempamine 水溶液の OMRI 画像の1.4 倍であった。

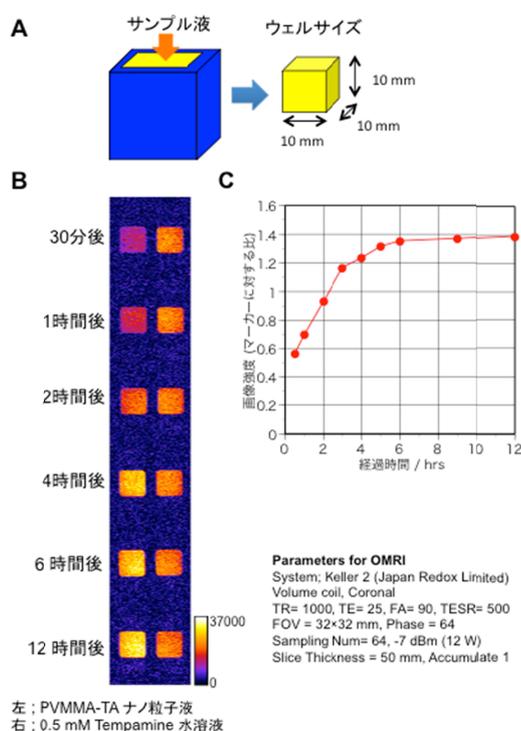


図2 PVM/MA-TAナノ粒子の疑似試料を用いたOMRIによる画像化の検討
A: 疑似試料の模式図、B: 疑似試料のOMRI画像、C: 画像強度(0.5 mM Tempamine水溶液; マーカーサンプルに対する)の経時変化

次に、PVM/MA-TA ナノ粒子液(ラジカル濃度 2 mM)を調製後、ウレタン麻酔したマウスの胃内に、すぐさまゾンデを用いて 0.4 mL 投与し、OMRI の撮像を5 時間にわたり 5-10 分毎に行った。得られた画像と、それらの画像強度の経時変化のグラフとを図3に示した。一方、フリーの1 mM Tempamine 水溶液をマウスの胃内に投与した後、OMRI の撮像を90

分間にわたり 5-10 分毎に行った。得られた画像の画像強度の経時変化を図 3B に併せて示した。ここでも単一磁石型の低磁場(0.02 テスラ)OMRI 装置(九州大学において開発)を用いた。

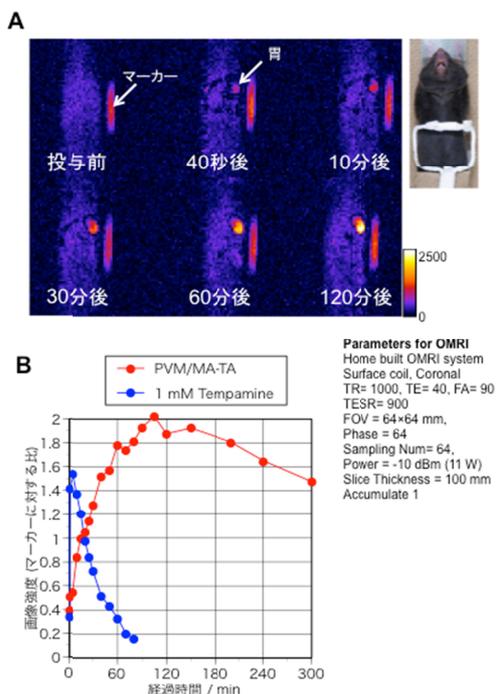


図3 PVM/MA-TAナノ粒子をマウスの胃内に投与した時のOMRIによる画像化の検討
 A: OMRI画像、B: 画像強度の経時変化(マーカーとして、0.5 mM Tempamine水溶液をターラム管に封入した物を用い、その画像強度に対する比をプロットした)

Tempamine 水溶液の場合、投与して直ぐさま画像強度が減衰し、90 分で画像強度が投与前のレベルに戻った。しかしながら、PVM/MA-TA ナノ粒子プローブ液の場合、投与直後の画像強度のレベルは低かったが、時間経過により画像強度の増大が見られ、2 時間程度でピークとなって、その後は減衰した。このようにPVM/MA-TA ナノ粒子プローブの方が、フリーの Tempamine よりも長時間にわたってマウスの胃内で画像化が可能であり、胃内での動態変化を調べるのに有効である。

PVM/MA-TA ナノ粒子の OMRI の画像強度が時間経過により増大する原因は明らかになっていないが、時間経過により高分子ナノ粒子の崩壊(ほぐれ)が生じ、PVM/MA に結合している Tempamine と、粒子周囲の水分子と

の相互作用が増大したことにより、OMRI の画像強度が増大した可能性が考えられる。本研究により、PVM/MA-TA ナノ粒子の疑似試料において、ESR スペクトルのピーク高さの増大(1.2 倍)よりも OMRI の画像強度の増大(2.4 倍)の方が 2 倍大きいことが明らかになった。このことは、ESR 法よりも OMRI の方が PVM/MA-TA ナノ粒子の動態変化の検知が容易なことを示唆している。

また、胃内に投与された PVM/MA-TA ナノ粒子においても、疑似試料のときと同様に、時間経過による画像強度の増大が見られた。この間は、ナノ粒子の崩壊が起こっていることが予想される。ナノ粒子に薬剤が内包されている場合、ナノ粒子の崩壊とともに薬剤の放出が加速する可能性がある。従って、ナノ粒子の崩壊を OMRI によって画像化して把握できれば、薬剤の徐放性を容易に評価できると考えられる。今回は PVM/MA-TA ナノ粒子をマウスの胃内に投与して OMRI 画像の取得を行ったが、腸で吸収がなされる薬物の徐放性評価のためには、PVM/MA-TA ナノ粒子を腸に投与して、その動態変化を調べることも期待される。

生体内においては高分子ナノ粒子の分布する濃度や薬物の徐放性能がレドックス状態など生体内環境によって変化する可能性がある。薬物の薬効についても、投与された生体部位のレドックス状態により変化する可能性もある。ニトロキシラジカルは生体レドックスの変動に感受性があり、OMRI による画像化によって生体のレドックス状態を知ることができる(ex. Utsumi *et al.*, 2006)。これを利用し、高分子ナノ粒子が投与された生体部位のレドックス状態を OMRI で画像化してそのレドックス情報を得れば、高分子ナノ粒子の薬物徐放性に生体内環境や薬効を関連づけた総合的な徐放性の評価を行うことが可能となる。

研究開始当初は高解像度の画像と解剖学

的位置情報の両方が得られる複数磁石型(サンプル周回型)の高磁場(1.5 テスラ)OMRI 装置(九州大学で開発)を用いて高分子ナノ粒子の OMRI 画像を取得する予定であったが、研究途中で装置の不具合が発生したため、単一磁石型の低磁場 OMRI 装置を用いて画像の取得を行った。生体に投与された高分子ナノ粒子の分布と、その動態変化をさらに詳細に知ることができれば、薬物徐放性の評価性能が高まるため、周回型の高磁場 OMRI による画像取得法が今後期待される。

引用文献

- (1) Kosem N, Naganuma T, Ichikawa K, Phumala Morales N, Yasukawa K, Hyodo F, Yamada K, Utsumi H. Whole-body kinetic image of a redox probe in mice using Overhauser-enhanced MRI. *Free Radic Biol Med.* 2012, 53, 328-336.
- (2) Arbos P, Campanero MA, Arango MA, Renedo MJ, Irache JM. Influence of the surface characteristics of PVM/MA nanoparticles on their bioadhesive properties. *J Control Release*, 2003, 89, 19-30.
- (3) Irache JM, Huici M, Konecny M, Espuelas S, Campanero MA, Arbos P. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules.* 2005, 10, 126-145.
- (4) Utsumi H, Yamada K, Ichikawa K, Sakai K, Kinoshita Y, Matsumoto S, Nagai M. Simultaneous molecular imaging of redox reactions monitored by Overhauser-enhanced MRI with ¹⁴N- and ¹⁵N-labeled nitroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103,1463-1468.

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

伊藤慎治、安川圭司、長沼辰弥、市川 和洋、内海 英雄、兵藤 文紀：周回型オーバー

ハウザーMRI によるマウス胃内投与ニトロキシルプローブの分子イメージング、フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 24 年 10 月 25 日 (名古屋)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 慎治 (ITO SHINJI)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・学術研究員

研究者番号：30570585

(2)研究分担者

兵藤 文紀 (HYODO FUMINORI)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：10380693

安川 圭司 (YASUKAWA KEIJI)

第一薬科大学・育薬研究センター・准教授
研究者番号：80372738