

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560037

研究課題名(和文) 表面化学修飾法による核磁気共鳴画像用ガドリニウム担持ナノダイヤモンド粒子の作製

研究課題名(英文) Fabrication of Gd(III)-DTPA-nanodiamond Particles by Chemical Modification for Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents

研究代表者

中村 拳子 (NAKAMURA, Takako)

独立行政法人産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：70357656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：表面化学修飾法を用いた核磁気共鳴画像(MRI)用ガドリニウム錯体担持ナノダイヤモンド粒子の作製法を開発した。ナノダイヤモンド粒子表面上に存在する水酸基を利用してキレート機能を有する有機分子を固定し、さらに造影能を有するガドリニウムイオンを錯形成させることにより、簡便な操作で作製が可能となった。また、MRI撮像結果により、ガドリニウム錯体担持ナノダイヤモンド粒子が高信号を示すことが明らかとなり、新規MRI造影剤開発への更なる検討が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a simple and useful process for fabricating nanodiamond (ND) particles modified with an organogadolinium moiety by chemical modification for their use as a magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent. The introduction of the organogadolinium moiety on the surface of the ND particles was performed by the condensation of ND and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) followed by treatment with GdCl₃. The modified surfaces were evaluated by X-ray photoelectron spectroscopy, diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, mass spectroscopy and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy analyses. MRI experiments on the Gd-DTPA-ND particles indicated their high signal intensity on T1-weighted images.

研究分野：炭素材料化学

キーワード：ナノダイヤモンド粒子 表面化学修飾 ガドリニウム 核磁気共鳴画像 造影剤

1. 研究開始当初の背景

ダイヤモンドは高硬度性、低摩擦低摩耗特性、電気的特性、生体親和性、化学的安定性を有するなど、種々の高機能特性を有することから注目を集めている材料である。特に、ミクロン粒径のダイヤモンド粉末は工業用研磨材として広く利用されている。近年、粒径サイズとしてナノメートルオーダーを有する各種ナノダイヤモンド (ND) 粒子が安定分散体および粉体形状で市販されるに至り、これまでの工業用研磨剤としての用途のみならず、ナノ粒子特有の高い比表面積およびカーボン材料特有の高い生体親和性への期待から、生体機能材料としての用途が模索され始めた。

ND 粒子の高機能特性を利用するためには、粒子表面特性の理解および更なる機能性付与に関する研究が必要となる。当該材料は基本的には化学的安定性を示すが、最表面末端構造を利用してダイヤモンド材料表面に何らかの方法で化学修飾を施すことにより、本来その材料が有する機能特性を活かしつつ、更なる高機能特性を付与する可能性が検討され、国内外でダイヤモンド材料表面への化学修飾に関する研究が近年活発に推進されてきた。ND 粒子表面への化学修飾については、主にその酸素末端構造を利用した有機化学的手法による表面化学修飾法が近年報告され始めている。熱および光化学ラジカル反応、プラズマ処理、ハロゲン原子修飾を経由した各種反応、およびシランカップリング剤を利用した反応などが報告されている。一方、病院臨床上で非常に重要な診断法となっている核磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging: MRI) は、癌や血管病変の描出に非常に有効であるが、既存のガドリニウム (Gd) 系 MRI 造影剤を用いた検査では診断精度に問題が残り、また検査ごとの頻回投与が必要であるため、副作用が一定の割合で生じる。このため、一定期間組織に停滞し、経過観察が可能であり、かつ生体適合性の高い新規 MRI 造影剤の開発が望まれている。ND 粒子は低細胞毒性・高生体適合性、さらに臓器特異性を有することが近年報告されており、MRI 造影能を有する ND 粒子作製が可能となれば、これまでの問題点を一気に解決する新規 MRI 造影剤となることが大きく期待される。これまで MRI 造影剤応用を目指した関連特許文献はあるものの、イオン注入および高温アニーリングが必要であることから、より簡便で効率的な新規手法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

表面化学修飾法を利用することにより、MRI 造影能を有する Gd 担持 ND 粒子の作製法を確立し、作製した金属含有 ND 粒子を利用した新規 MRI 造影剤開発を目的とする。具体的には、表面官能基に適した既存の有機化学反応、およびこれまで独自に開発した手

法である各種官能基化法を利用し、官能基化 ND 粒子を経由した Gd 担持 ND 粒子作製法の確立について検討する。修飾処理された ND 粒子は、シリコンなど他の材料と比較しても非常に化学的および物理的に安定であり、ナノ粒子特有の高い比表面積を有し、さらに炭素原子のネットワークであることから生体親和性が高く、ND 粒子特有の臓器特異性を有することが期待される。そこで、Gd 担持 ND 粒子について、分散性評価および実際の MRI 装置による撮像を行い、その造影能について明確にする。また、将来的な体内動態の検討に向けた細胞毒性実験および安定性評価についても検討する。

3. 研究の方法

(1) ガドリニウム担持ナノダイヤモンド粒子作製法の開発

第一段階として ND 粒子表面上に存在する水酸基を利用した化学反応により、金属イオンとの高いキレート機能を有する有機分子 (ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)) を化学修飾した。さらに第二段階として、MRI 造影能を有する Gd イオンを錯形成させることにより、Gd 担持 ND 粒子を作製した。使用する ND 粒子については、5~500 nm オーダー粒径の試料が入手可能であることから、種々の粒径を有する ND 粒子について試料作製を行った。作製した Gd 担持 ND 粒子については、XPS, FTIR, 質量分析等を用いて分析を行い、XPS 測定からは DTPA 分子修飾および Gd 担持に伴う導入元素の確認、FTIR 測定により ND 粒子表面上の化学反応に伴う官能基変換の確認、質量分析により表面化学修飾されたキレート分子導入の確認を行った。

(2) ガドリニウム担持ナノダイヤモンド粒子の分散性および MRI 撮像

上記で作製した Gd 担持 ND 粒子について、MRI 撮像の事前準備として、リン酸緩衝生理食塩水、注射液等への分散挙動を明らかにするとともに、ゼータ電位測定により分散性について確認した。また、ICP-MS 分析を行うことにより Gd 担持量を明らかとした。最適分散条件を用いた Gd 担持 ND 粒子分散液を用い、MRI 装置による T1 強調画像撮像を測定し、新規造影剤適用への可能性について検討した。

(3) 分散ガドリニウム担持ナノダイヤモンド粒子の安全性評価

Gd 担持 ND 新規造影剤の将来的な体内動態について検討するため、正常肝細胞による細胞毒性実験を行った。

4. 研究成果

(1) ガドリニウム担持ナノダイヤモンド粒子作製法の開発

スキーム 1 に示したように、ND 粒子 (粒径 5 nm, 600 mg) およびジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA, 1 g) の塩化メチレン懸濁液 (20

m1) を調整し、塩化チオニル共存下で脱水縮合反応を行った反応後、塩化メチレン、水酸化ナトリウム水溶液、メタノールで ND 粒子を洗浄したさらに Gd 錯形成のため、DTPA 修飾 ND 粒子 (100 mg) に 0.15 M 塩化ガドリニウム水溶液 (2 ml) を作用させた。錯形成プロセス処理後、修飾 ND 粒子を純水およびメタノールで洗浄し、真空下で乾燥を行った修飾 ND 粒子について DRIFT, XPS, MS, ICP-AES 分析を行った。

図 1 a-c に未処理および DTPA 化学修飾処理 ND 粒子の DRIFT スペクトルを示す。未処理 ND 粒子はその表面上に水酸基を多く有することが観察され (図 1a)、指紋領域 (650-1300 cm^{-1}) における未処理 ND 粒子、DTPA のスペクトルとの比較から、DTPA 部分が ND 粒子表面に導入されたことが示唆される (図 1b, c)。DTPA 修飾 ND 粒子は 1633 cm^{-1} に C=O に由来する強いピークを示し、DTPA 分子内のカルボン酸および窒素原子による分子内水素結合に由来すると考えられる。

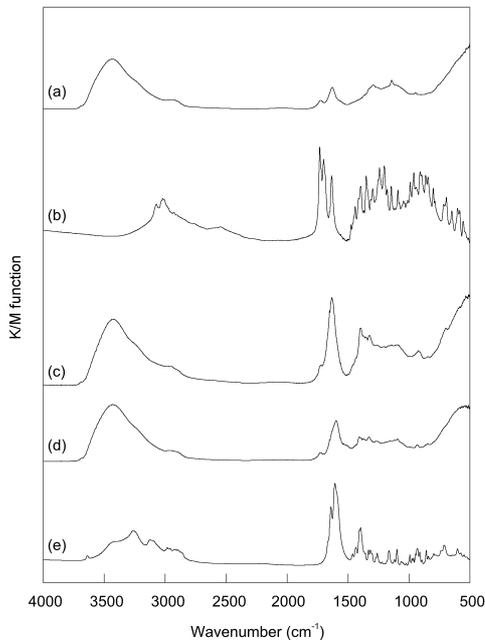


図 1 (a) 未処理 ND (b) DTPA (c) DTPA-ND (d) Gd-DTPA-ND (e) ガドジアミドの DRIFT スペクトル

また、図 2 に反応処理前後の ND 粒子の XPS スペクトルを示す反応処理後の試料においては、未処理 ND 粒子と比較して、ND 粒子由来の C1s (284.6 eV) および O1s (531.2 eV) とともに、新たに DTPA 分子由来の N1s (398.9

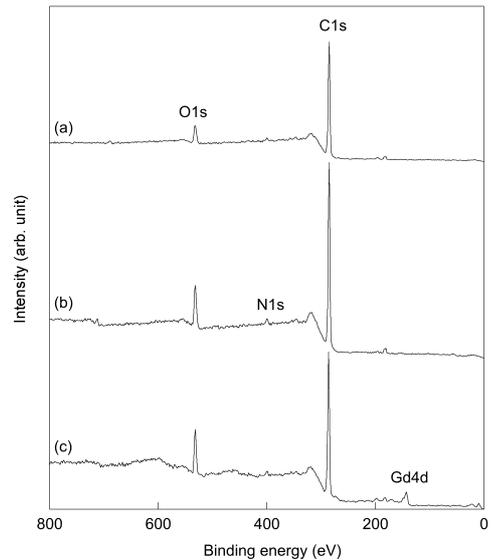


図 2 (a) ND (b) DTPA-ND (c) Gd-DTPA-ND の XPS スペクトル

eV) のピークが観測された。

さらに、処理後試料および DTPA 分子の MS スペクトルの比較から、処理後試料には DTPA 部分に由来するフラグメントピークが観測された (図 3)。以上の DRIFT, XPS および MS 測定の結果から、ND 粒子表面上の水酸基と DTPA 分子のカルボン酸基が脱水縮合を起こすことにより ND 粒子表面にエステル結合を介して DTPA 分子が化学的に固定されたことが明らかとなった。

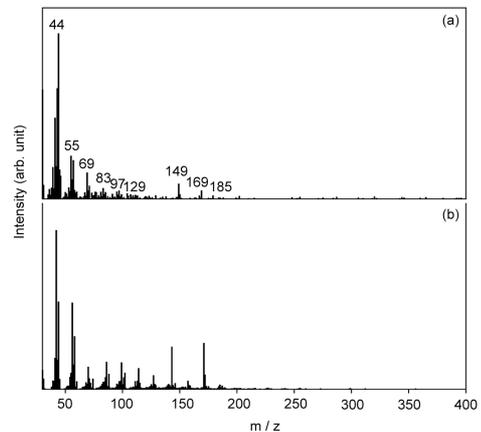
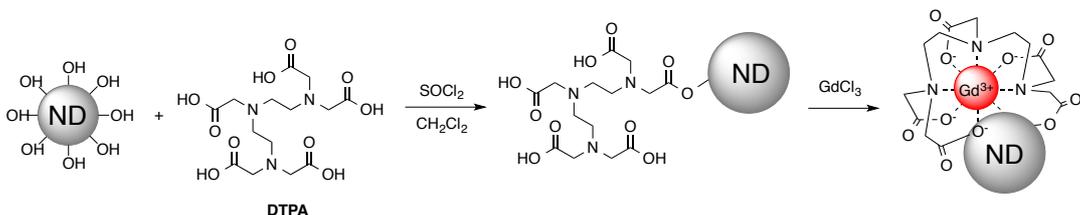


図 3 (a) DTPA-ND (b) DTPA の MS スペクトル

上記 DTPA 修飾 ND 粒子に塩化ガドリニウム水溶液を作用させることにより錯形成処理を



行った処理後の試料について XPS 分析を行ったところ (図 2c)、Gd4d (141.3 eV) および N1s (399.2 eV) ピークが観測されたことから、錯形成により Gd-DTPA-ND 粒子が形成されたことを明らかにした。特に、Gd4d ピークについて、市販 MRI 造影剤であるガドジアミドとの比較を行ったところ、ほぼ同位置の 141.9 eV にピークが観測されたことから Gd イオンの錯形成が示唆される (図 4)。

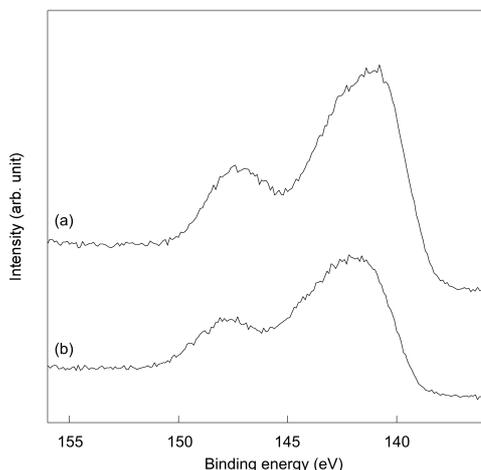


図 4 (a) Gd-DTPA-ND (b) ガドジアミドの Gd4d XPS スペクトル

また、Gd-DTPA-ND 粒子およびガドジアミドの DRIFT スペクトルの比較からも Gd イオンの錯形成が示唆された。すなわち、Gd-DTPA-ND 粒子のカルボン酸アニオンは Gd イオンとの錯形成により 1600 cm^{-1} に観測され、ガドジアミドとのピーク位置 (1607 cm^{-1}) の比較からも錯形成が示唆された (図 1d, e)。Gd-DTPA-ND 粒子の Gd イオンは ND 粒子表面の水酸基との相互作用によって、その錯形成がより安定化していることが考えられる。さらに、ICP-AES 測定により Gd イオンの表面濃度を測定したところ、 $94.5\text{--}95.5\text{ mg/g}$ であった。さらに粒径 50, 100 nm の ND 粒子を用いて Gd 担持 ND 粒子作製を検討したところ、粒径 5 nm 品と同様の手法により 50, 100 nm 品においても作製が可能であることが明らかとなった。

(2) ガドリニウム担持ナノダイヤモンド粒子の分散性および MRI 撮像

Gd 担持 ND 粒子について、水分散液のゼータ電位 pH 依存性を測定することにより、各プロセスにおける表面化学修飾に関する確認を行った (図 5)。基材である ND 粒子は pH 2-11 の範囲において $+33\text{--}7\text{ mV}$ の電位が観測され、表面上に多数の水酸基が存在することが再度確認された。ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) 修飾 ND 粒子については、ND 粒子表面の水酸基と DTPA 分子が化学結合されることにより、酸性 pH においてゼータ電位低下の現象が確認された。さらに Gd 担持

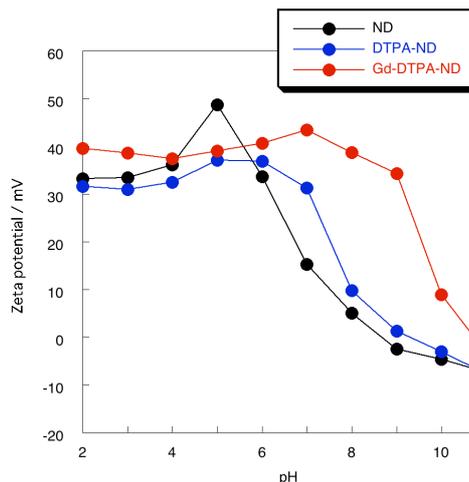


図 5 各種 pH における ND, DTPA-ND, Gd-DTPA-ND のゼータ電位

DTPA 修飾 ND 粒子については、Gd イオン担持のためにゼータ電位が増加した。また、ICP-AES 測定により Gd イオンの表面濃度が 95 mg/g であることが確認された。本 ND 粒子について MRI 撮像のコントラストを観察するため、病院用 1.5 T MRI 装置による Gd-DTPA-ND 分散液の T1 強調画像を撮影した Gd-DTPA-ND のリン酸バッファー溶液 (PBS) および注射用水の 0.1 w/v % 分散液を調整して撮像を行ったコントロール実験の未処理 ND 分散液と比較して、Gd-DTPA-ND 分散液のみが高い信号強度を示したことから、新規 MRI 造影剤開発への更なる検討が期待される (図 6)。特に、既存造影剤との信号強度比較を行ったところ、Gd 濃度 1/10 においても同等の造影増強効果が観察され、低使用量を可能とする新規造影剤となることが期待される。

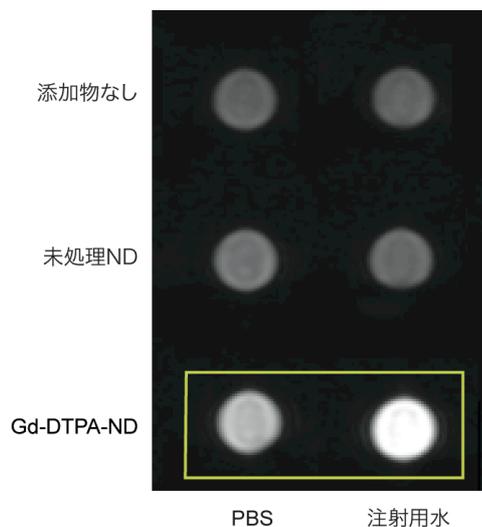


図 6 未処理 ND および Gd-DTPA-ND の MRI T1 強調画像

(3) 分散ガドリニウム担持ナノダイヤモンド粒子の安全性評価
さらに、Gd 担持 ND 粒子 (粒径 5 nm) を用いた肝細胞による細胞毒性試験を行ったところ、既存造影剤と比較して同様の結果を示し、in vitro においては問題のないことが明らかとなった。

(4) 展望

化学修飾ダイヤモンド材料については国内外機関においてここ数年活発に研究されており、ダイヤモンド系材料の表面科学および表面修飾に関するテーマは現在非常に注目を集めており、現在および将来における有望な研究分野である。

本研究課題においては、これまでの化学修飾に関する成果全体を踏まえ、かつ医工連携的なアプローチから MRI 新規造影剤適用を目指した修飾分子および最適修飾方法のデザインを行い、MRI 造影能を有する Gd 担持 ND 粒子を作製し、さらに修飾 ND 粒子を利用した具体的な MRI 撮像に成功した。

表面化学修飾法を用いた Gd 錯体担持 ND 粒子の作製法を開発した本手法を用いることにより、ND 粒子から簡便な操作で作製が可能となった。Gd³⁺-ND 間にはリンカーが存在しないため、ND 表面上の酸素系官能基で Gd³⁺錯形成を安定化している可能性があるまた、MRI 撮像結果により、Gd³⁺担持 ND 粒子のみが高信号を示すことが明らかとなり、新規 MRI 造影剤開発への更なる検討が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① T. Nakamura, T. Ohana, H. Yabuno, R. Kasai, T. Suzuki, T. Hasebe, Simple fabrication of Gd(III)-DTPA-nanodiamond particles by chemical modification for use as magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent, Appl. Phys. Express, 査読有, vol. 6, 2013, 015001.
DOI: 10.7567/APEX.6.015001
- ② 中村 挙子, 大花 継頼, 藪野 元, 笠井 ルミ子, 鈴木 哲也, 長谷部 光泉, 化学修飾ナノダイヤモンド粒子 MRI 造影剤の作製, 電子情報通信学会技術研究報告, 査読無, vol. 113-17-18, 2013, 57-60.
- ③ 中村 挙子, 表面化学修飾を利用した機能性・生体適合材料の開発, 電子情報通信学会技術研究報告, 査読無, vol. 113-375, 2013, 13-18.
- ④ 中村 挙子, 大花 継頼, 土屋 哲男, 松本 知博, 鈴木 哲也, 長谷部 光泉, 化学修飾ナノダイヤモンド粒子 MRI 造影剤, NEW DIAMOND, 査読無, vol. 31, 2015, 19-22.

[学会発表] (計 11 件)

- ① R. Kasai, T. Nakamura, T. Ohana, A. Hotta,

T. Suzuki, T. Hasebe, Nanodiamond-gadolinium conjugates as a MRI novel contrast agent for medical diagnosis, ICDCM 2012, 2012 年 9 月 5 日, グラナダ (スペイン)

- ② 中村 挙子, 大花 継頼, 藪野 元, 笠井 ルミ子, 鈴木 哲也, 長谷部 光泉, 化学修飾法によるナノダイヤモンド粒子 MRI 造影剤の作製, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 23 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県)
- ③ 中村 挙子, 大花 継頼, 藪野 元, 笠井 ルミ子, 鈴木 哲也, 長谷部 光泉, 化学修飾ナノダイヤモンド粒子 MRI 造影剤の作製, 有機エレクトロニクス研究会, 2013 年 4 月 2 日, 屋久島環境文化村センター (鹿児島県)
- ④ 中村 挙子, 大花 継頼, 土屋 哲男, 藪野 元, 笠井 ルミ子, 鈴木 哲也, 長谷部 光泉, MRI 造影剤用化学修飾ナノダイヤモンド粒子の作製, 第 74 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013 年 9 月 1 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府)
- ⑤ 中村 挙子, 表面化学修飾を利用した機能性・生体適合材料の開発, 有機エレクトロニクス研究会, 2013 年 12 月 27 日, まりんぴあ宮古 (沖縄県)
- ⑥ 中村 挙子, 表面化学修飾技術による機能性材料の開発-表面濡れ性制御および生体医療材料への展開-, 国際医薬品原料・中間体展 2014 TLO/知的財産本部技術移転セミナー, 2014 年 4 月 10 日, 東京ビッグサイト (東京都)
- ⑦ 中村 挙子, 大花 継頼, 土屋 哲男, 藪野 元, 笠井 ルミ子, 鈴木 哲也, 長谷部 光泉, Fabrication of Gd(III)-DTPA-nanodiamond Particles by Chemical Modification for Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agent, IUMRS-ICA 2014, 2014 年 8 月 29 日, 福岡大学七隈キャンパス (福岡県)
- ⑧ 中村 挙子, 表面化学修飾技術によるカーボン系機能性材料の開発, 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 2014 年 9 月 18 日, 北海道大学札幌キャンパス (北海道)
- ⑨ 中村 挙子, 大花 継頼, 土屋 哲男, 松本 知博, 鈴木 哲也, 長谷部 光泉, 化学修飾ナノダイヤモンド粒子 MRI 造影剤の作製, 第 28 回ダイヤモンドシンポジウム, 2014 年 11 月 20 日, 東京電機大学東京千住キャンパス (東京都)
- ⑩ 長谷部 光泉, 松本 知博, 中村 挙子, 大花 継頼, 堀田 篤, 鈴木 哲也, 炭素系材料が開く新世代医療器具の開発, 第 2 回ナノカーボンバイオシンポジウム, 2015 年 2 月 20 日, 東京大学伊藤国際学術研究センター (東京都)
- ⑪ 中村 挙子, 大花 継頼, 土屋 哲男, 松本 知博, 鈴木 哲也, 長谷部 光泉, Fabrication of Gd(III)-DTPA-nanodiamond Particles

by Chemical Modification for Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents, NDNC 2015, 2015年5月26日, グランシップ (静岡県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.aist.go.jp/digbook/openlab/2012/index.html#page=291>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 挙子 (NAKAMURA, Takako)

独立行政法人産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：70357656

(2) 研究分担者

長谷部 光泉 (HASEBE, Terumitsu)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20306799

(3) 連携研究者

大花 継頼 (OHANA, Tsuguyori)

独立行政法人産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究部門・グループ長

研究者番号：10356660