

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07906

研究課題名(和文) フッ素MRIマルチカラーイメージングを目指した新規機能性イオン液体ナノ粒子の創製

研究課題名(英文) Development of novel functional ionic liquid nanoparticles applicable for multicolor imaging of fluorine-MRI

研究代表者

武上 茂彦 (Takegami, Shigehiko)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70298686

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)：フッ素MRIのマルチカラーイメージングを目指し、フッ素を有するイオン液体(IL)を用いたイオン液体ナノ粒子(ILNP)の調製とマウスにおける体内動態の評価、およびフッ素MRIプローブの合成をおこなった。その結果、エマルション様のILNPが調製でき、その体内動態においては腎臓に蓄積することが示された。また、癌細胞に高発現しているγ-グルタミルトランスフェラーゼの基質であるグルタチオンを用いて新規にフッ素MRIプローブを合成することができた。

研究成果の概要(英文)：For the development of multicolor imaging of fluorine-MRI, the aim of this study was to prepare the ionic liquid nanoparticles (ILNPs) using the ionic liquid (IL) having fluorine atoms, to evaluate their pharmacodynamics in mice and further to synthesize a novel fluorine-MRI probe. The NMR spectroscopic results, ¹H-, ¹⁹F-, ³¹P- and ¹H-¹H NOESY, showed that the ILNP formed an IL-in-water type emulsion in which droplets of IL were surrounded by the surfactants. In addition, the ILNP accumulated higher in kidney than in liver, indicating that fluorine-containing anions of IL were immediately released from the ILNP in blood circulation after the administration in mice. Also, a fluorine-MRI probe could be newly synthesized from the glutathione, which is a substrate for γ-glutamyltransferase which exists in high concentration in cancer cells.

研究分野：分析化学

キーワード：イオン液体 ナノ粒子 NMR MRI イメージング 癌

1. 研究開始当初の背景

現在、病態の画像診断法として X 線 CT や MRI, SPECT, PET がある. その中でも MRI は, 体外から非侵襲的に体内深部の疾患部位を撮像できるため臨床現場で広く利用されている. 一般に用いられている MRI は, ^1H -MRI であり, 体内の水や脂質などの水素原子核を利用して画像化されている. しかし, MRI は他の画像診断法と比較して感度が著しく劣っている (問題点 1). その理由として, ^1H は生体中に極めて多く存在しているため, 大きなバックグラウンドノイズを生じるためである. この問題を解決するためには, 磁場を強くすれば良いのだが, 高磁場が及ぼす人への影響がまだ明らかとなっていないため, ハード面において今以上に高感度にするのは困難である. そこで感度の低さを補うため, ^1H -MRI において造影剤が用いられているが, 必ずしも疾患部位に特異的というわけではない (問題点 2). この問題を解決するために, 生体内の疾患部位に高発現している酵素反応を利用した ^1H -MRI プローブが種々考案され, 生体内酵素や疾患部位を特異的に検出できることが報告されている (Chen 他, *Radiology*, 240, 473(2006)). しかし, これらの研究においても生体内 ^1H に起因する高いバックグラウンドシグナルの問題を完全に解決するには至っていない. このため, ^1H -MRI ではソフト面においても今以上の高分解能化は困難である. 加えて, ^1H -MRI は正常部位の ^1H の緩和時間を基準として疾患部位の ^1H のわずかな緩和時間の変化を観測し白黒の濃淡で画像化しているため, 正常部位と疾患部位のコントラストが明瞭でない結果, 高分解能の画像が撮像できない (問題点 3). 実際, X 線 CT と比較した場合, X 線 CT では 0.5 mm 程度の腫瘍を検出できるが, ^1H -MRI では 0.8 mm 程度の腫瘍しか検出できない. これら 3 つの問題点に対して, 包括的に一度に解決できるような革新的な研究はまだおこなわれていない.

2. 研究の目的

本研究は, 上述の解決策に応える複数の機能性 (^{19}F シグナル源・DDS キャリヤー・マルチカラーイメージング源) を 1 つのナノ粒子が有する, 革新的な機能性イオン液体ナノ粒子 (Functional ionic liquid nanoparticle;

FILNP) を創製し, ^{19}F -MRI による「癌組織のマルチカラーイメージング」の基盤を構築することを目的とした. すなわち, 1) アニオンにフッ素原子を有した FILNP の調製, 2) 癌細胞に高発現している酵素 (γ -グルタミルトランスフェラーゼ; γ -GT) に対する基質 (L-グルタチオン; GSH) を利用した新規 ^{19}F -MRI プローブ (^{19}F -GSH) の合成, 3) FILNP のマウスにおける体内動態の評価, である.

3. 研究の方法

1) FILNP の調製: 用いた IL として, *N*-(2-methoxyethyl)-*N*-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ($[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$) を選択した. $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$ (0.4 g), Tween 20 (1.5 g), Span 80 (1.5 g) に, 4 mL の蒸留水を加え, ホモジナイザーで 45 分間攪拌し, FILNP を得た. この FILNP 懸濁液について, ^1H -および ^{19}F -NMR, ^1H - ^1H NOESY スペクトルを測定した.

2) ^{19}F -GSH の合成: Fig. 1 に合成スキームを示す. 三角フラスコに, モル比が 1:1 となるように, GSH (11.95 mg, 3.89 μmol) と *N*-[*p*-(trifluoromethoxy)phenyl] maleimide (TMPM, 10.00 mg, 3.89 μmol) を秤量し, メタノールを 170 mL 加え室温で 3 時間攪拌し, ^{19}F -GSH を合成した.

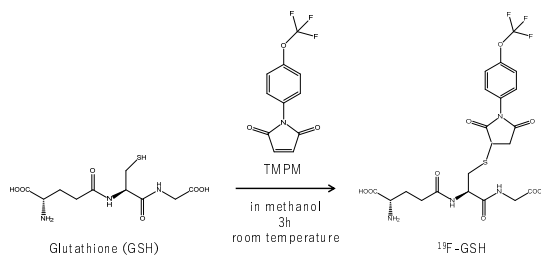


Fig. 1. ^{19}F -GSH の合成法.

3) 体内動態の評価: 当研究室で新規に合成したフッ素化トコフェロール (^{19}F -TP) と $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$ を混合し, ホスファチジルコリンとパルミチン酸ナトリウムを加え, 7 mL の蒸留水中で超音波処理法を用いて脂質ナノエマルジョン (LNE) を調製した. この LNE 懸濁液 100 μL をマウスの尾静脈から投与し, 麻酔下において血液, 肝臓, 腎臓を採取した. 採取した血液 300 μL に基準物質 ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Na}$) を含む重水溶液 300 μL を加

え測定試料とした。一方、肝臓および腎臓は、Lysis 緩衝液を加えホモジナイザーを用いて懸濁液とし、この懸濁液を血液と同様の操作に従って測定試料とした。これらの測定試料について ^{19}F -NMR スペクトルを測定した。

4. 研究成果

1) FILNP の調製: Fig. 2 に、 $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$ 、Tween 20 と Span 80 を用いて調製したミセル、FILNP 懸濁液の ^1H -NMR を示す。Fig. 2(a) のピークはそれぞれ、図中の $[\text{Pyr}_{1201}]^+$ カチオンの各 ^1H に帰属された。

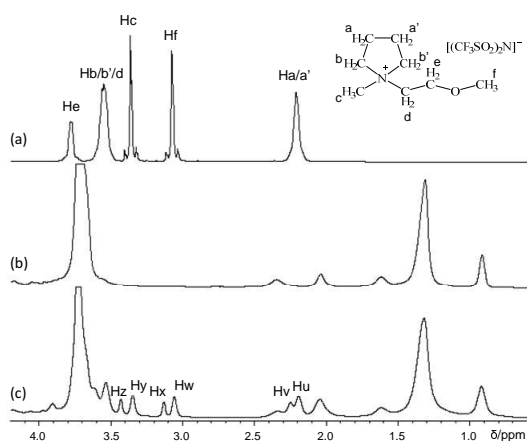


Fig. 2. (a) $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$, (b) Tween 20 と Span 80 で調製されたミセル, (c) FILNP 懸濁液の ^1H -NMR スペクトル。

Fig. 2(c)において、(a)でも見られたピークの低磁場側に新しいピーク (Hv, Hx, Hz) が出現した。これら低磁場側に現れたピークが何であるのかを明らかにするために、 ^{19}F -NMR スペクトルを測定した。その図を Fig. 3 に示す。

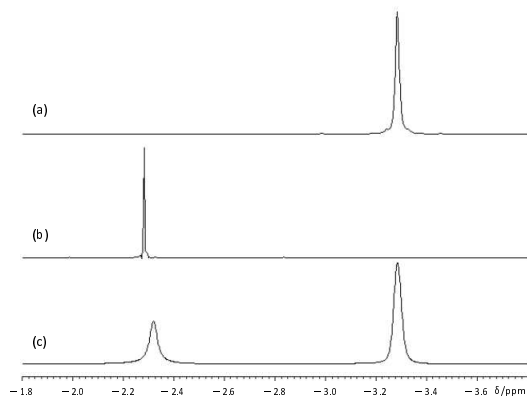


Fig. 3. (a) $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$, (b) 10 mM $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$ 水溶液, (c) FILNP 懸濁液の ^{19}F -NMR スペクトル。

Fig. 3(c)で見られるように、FILNP 懸濁液

では $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオンのピークが 2 本観測された。Fig. 3(a)と(b)から、FILNP の $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオンの 2 本のピークは、高磁場側が IL 状態を保持している $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオン由来、低磁場側が懸濁液中にフリー体で存在している $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオン由来のピークであることがわかった。したがって、Fig. 2(c)の ^1H -NMR スペクトルで観測されたピーク (Hv, Hx, Hz) は、IL から解離し、フリー体で懸濁液中に存在している $[\text{Pyr}_{1201}]^+$ カチオン由来のピークであることが示された。

次に、FILNP の粒子構造を明らかにするために、FILNP 懸濁液の ^1H - ^1H NOESY スペクトルを測定した。その結果を Fig. 4 に示す。

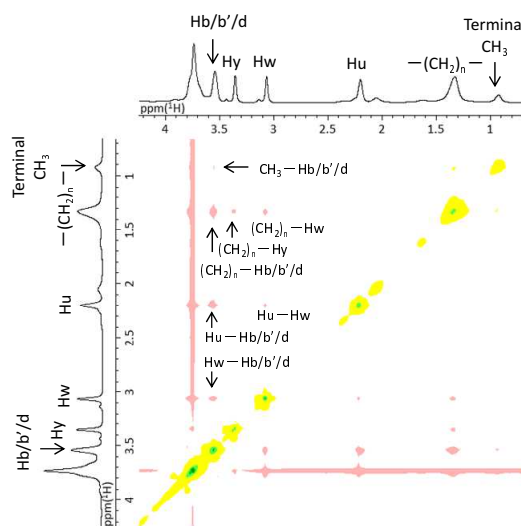


Fig. 4. FILNP 懸濁液の ^1H - ^1H NOESY スペクトル。

Tween 20 や Span 80 の疎水部位である $-(\text{CH}_2)_n-$ と $[\text{Pyr}_{1201}]^+$ カチオン由来のピークとの間でクロスピークが観測された。この結果から、Tween 20 や Span 80 の $(\text{CH}_2)_n$ 鎖が $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$ の疎水部分に挿入されていることが示された。以上の NMR スペクトルの結果を総合的に考察すると、本研究で調製された FILNP は、一部解離したアニオン・カチオンが懸濁液中に存在するものの、大部分のアニオンとカチオンが IL 状態を維持しつつ油滴を形成し、その周囲を界面活性剤が取り囲んだ IL-in-water 型エマルジョンであることがわかった。

2) ^{19}F -GSH の合成: Fig. 1 の合成スキームにより、 ^{19}F -GSH を合成した結果、その収率は 16.3%であった。期待したよりも低収率であ

った要因は、比較的水溶性物質であったため、精製法が不十分であったことが挙げられた。今後、精製法について詳細に検討していく予定である。

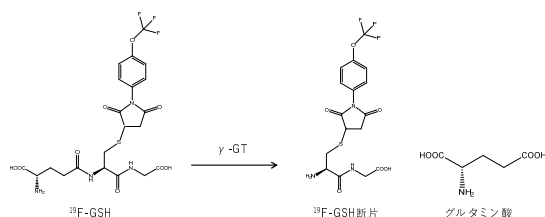


Fig. 5. ^{19}F -GSH と γ -GT との反応。

新規に合成した ^{19}F -GSH は、Fig. 5 に従って ^{19}F -GSH 断片とグルタミン酸を生じると考えられる。 ^{19}F -NMR スペクトルにおいて、 ^{19}F -GSH と ^{19}F -GSH 断片のピークの化学シフト値がそれぞれ異なれば、 γ -GT が高発現している細胞（がん細胞）と正常細胞を区別することが可能となる。そこで、 γ -GT 存在下で ^{19}F -GSH の ^{19}F -NMR スペクトルを測定した。その結果を Fig. 6 に示す。

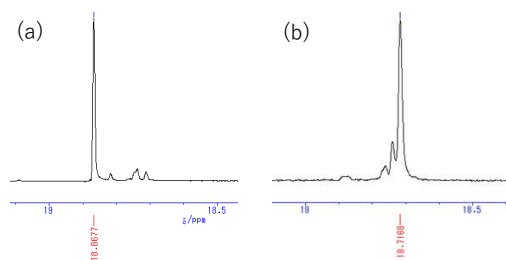


Fig. 6. γ -GT の(a)非存在下および(b)存在下における ^{19}F -GSH の ^{19}F -NMR スペクトル。

Fig. 6(a)で見られるように、 γ -GT 非存在下において、 ^{19}F -GSH のピークは 18.87 ppm に観測された。一方、Fig. 6(b)のように、 γ -GT が γ -GT/ ^{19}F -GSH=0.1 の比で存在する場合、 ^{19}F -GSH のピークは 18.72 ppm に高磁場シフトした。この結果から、 ^{19}F -GSH と ^{19}F -GSH 断片のケミカルシフト値は異なることが示された。

γ -GT を ^{19}F -GSH に対して種々の割合で共存させた場合の ^{19}F -GSH 断片の生成割合を ^{19}F -NMR スペクトルでの各々のピーク強度比から求めた。その結果を Fig. 7 に示す。 γ -GT の割合が増加するにつれて、顕著に ^{19}F -GSH 断片の割合が増加した。この結果から、 ^{19}F -GSH は γ -GT 量に応じてピーク強度が変化するプローブであることが示された。

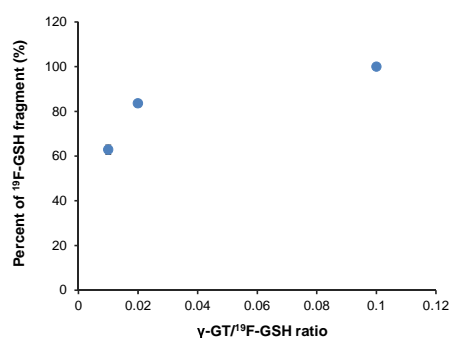


Fig. 7. 種々の割合の γ -GT 存在下における ^{19}F -GSH 断片の生成割合。

3) 体内動態の評価：調製した LNE をマウスに投与し、20 分後に得られた血液、肝臓、腎臓の測定試料について ^{19}F -NMR スペクトルを測定した。その結果の 1 例として、血液の ^{19}F -NMR スペクトルを Fig. 8 に示す。

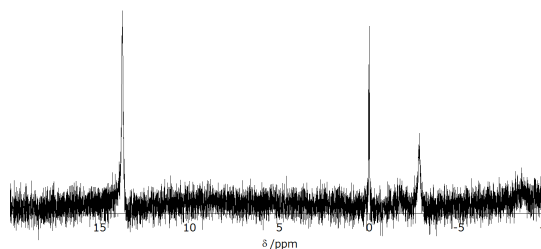


Fig. 8. LNE 投与 20 分後に採取されたマウス血液の ^{19}F -NMR スペクトル。

高磁場側より -2.3, 0, 13.8 ppm に観測されるピークはそれぞれ、 $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオン、 $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Na}$ 、 ^{19}F -TP 由来のものである。 $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオン由来のピークが -2.3 ppm に観測され、これは Fig. 3 で見られた、遊離した $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオンのピークとほぼ同じ化学シフト値であった。この結果から、LNE 中に封入した $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$ の $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオンは、血中投与後速やかに LNE から放出されていることが示唆された。

$\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Na}$ 濃度は $100 \mu\text{M}$ であることから、 $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Na}$ とのピーク強度比を算出することにより、測定試料中に存在する $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオン濃度を計算した。その結果として、 $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオンは初回投与量に対し、血液中に 18%、肝臓には 7%、腎臓には 21% 存在していることが示された。これは、LNE に封入した $[\text{Pyr}_{1201}][\text{Tf}_2\text{N}]$ は生体内投与後、LNE から速やかに放出され、IL 状態から解離し、 $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオンとなるため腎臓に高濃度蓄積していたのではないかと考えられ

た。またこれらの結果から、 $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ アニオンと ^{19}F -TP のピーク強度比は血液や臓器ごとに異なっていたので、ピーク強度比を赤色/青色の混合色比に対応させれば、本研究の目標であるマルチカラーイメージングが達成できる可能性が示された。

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 6 件)

1. Shigehiko Takegami, Kisho Watanabe, Atsuko Konishi, and Tatsuya Kitade
“Formation of ionic liquid submicron particles. ^1H and ^{19}F nuclear magnetic resonance spectroscopic studies”
J. Dispersion Sci. Technol., **39**, 1040-1046 (2018). 査読有
DOI : 10.1080/01932691.2017.1381617
2. Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami, Shoko Akatani, Rie Takemoto, and Tatsuya Kitade
“Potentiometric and ^1H NMR spectroscopic studies of functional monomer influence on histamine-imprinted polymer-modified potentiometric sensor performance”
J. Anal. Bioanal. Tech., **8**, 1000378 (2017). 査読有
DOI : 10.4172/2155-9872.1000378
3. Ryoko Yamamoto, Shigehiko Takegami, Atsuko Konishi, Hikari Horikawa, Sayumi Yonezawa, and Tatsuya Kitade
“Polydiacetylene liposomal aequorin bioluminescent device for detection of hydrophobic compounds”
Anal. Chem., **88**, 5704-5709 (2016). 査読有
DOI : 10.1021/acs.analchem.5b04500
4. Shigehiko Takegami, Keisuke Kitamura, Mayuko Ohsugi, Atsuko Konishi, and Tatsuya Kitade
“ ^{19}F nuclear magnetic resonance spectrometric determination of the partition coefficients of flutamide and nilutamide (antiprostata cancer drugs) in a lipid nano-emulsion and prediction of

its encapsulation efficiency for the drugs”
AAPS Pharm. Sci. Tech., **17**, 1500-1506 (2016). 査読有

DOI : 10.1208/s12249-016-0495-1

5. Shigehiko Takegami, Hidemasa Katsumi, Kei Asai, Daisuke Fujii, Taisuke Fujimoto, Haruka Kawakami, Tomomi Tokuyama, Atsuko Konishi, Akira Yamamoto, and Tatsuya Kitade
“Application of ^{19}F NMR spectroscopy using a novel α -tocopherol derivative as a ^{19}F NMR probe for a pharmacokinetic study of lipid nano-emulsions in mice”
Pharm. Anal. Acta, **6**, 339 (2015). 査読有
DOI : 10.4172/2153-2435.1000339
6. Shigehiko Takegami, Keisuke Kitamura, Mayuko Ohsugi, Aya Ito, and Tatsuya Kitade
“Partitioning of organophosphorus pesticides into phosphatidylcholine small unilamellar vesicles studied by second-derivative spectrophotometry”
Spectrochim. Acta, Part A, **145**, 198-202 (2015). 査読有
DOI : 10.1016/j.saa.2015.02.061

[学会発表] (主要発表 11 件, 計 24 件)

- ① 亀澤未央, 樋口慧, 武上茂彦, 小西敦子, 北出達也
「親水性脂肪族系イオン液体ナノ粒子の調製と多核 NMR 解析」
第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会
平成 29 年 10 月 14 日
兵庫医療大学 (神戸)
- ② 国府茉里子, 武上茂彦, 小西敦子, 北出達也
「フッ素含有化合物を結合させたグルタチオンを母体とする ^{19}F -MRI プローブの合成と評価」
第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会
平成 29 年 10 月 14 日
兵庫医療大学 (神戸)
- ③ Shigehiko Takegami, Kisho Watanabe, Chigusa Yamada, Hiroaki Kaneda, Mako Yoshida, Atsuko Konishi and Tatsuya Kitade
“ ^1H , ^{19}F and ^{31}P NMR spectroscopic studies on the formation of ionic liquid submicron

particles prepared by different surfactants”
Euroanalysis 2017

平成 29 年 8 月 28 日～9 月 1 日

ストックホルム大学 (ストックホルム・スウェーデン)

④ 田島栞, 峯松奈央, 飯間莉紗, 武上茂彦, 小西敦子, 北出達也

「¹⁹F-NMR を用いた種々の脂質ナノエマルジョンの温度応答に対する中性脂質の影響の検討」

第 77 回分析化学討論会

平成 29 年 5 月 27～28 日

龍谷大学深草学舎 (京都)

⑤ 峯松奈央, 田島栞, 飯間莉紗, 武上茂彦, 小西敦子, 北出達也

「トリアラキジンナノエマルジョンに封入した ¹⁹F-NMR プローブの緩和時間 T_1 と T_2 の温度依存性」

第 77 回分析化学討論会

平成 29 年 5 月 27～28 日

龍谷大学深草学舎 (京都)

⑥ 武上茂彦, 渡辺暉生, 山田千草, 金田浩明, 吉田真子, 小西敦子, 北出達也

「多核 NMR を用いたイオン液体ナノ粒子形成に及ぼす界面活性剤の影響の検討」

日本薬学会第 137 年会

平成 29 年 3 月 24～27 日

仙台国際センター・東北大学川内地区 (仙台)

⑦ 飯間莉紗, 峯松奈央, 田島栞, 武上茂彦, 小西敦子, 北出達也

「¹⁹F-NMR を用いた脂質ナノエマルジョンの温度応答性の検討」

日本薬学会第 137 年会

平成 29 年 3 月 24～27 日

仙台国際センター・東北大学川内地区 (仙台)

⑧ 武上茂彦, 中尾佳那美, 福田浩史, 山田しおり, 小西敦子, 北出達也

「イオン液体およびイオン液体ナノ粒子中のピレンの蛍光増強の比較」

第 7 回イオン液体討論会

平成 28 年 10 月 24～25 日

金沢市文化ホール (金沢)

⑨ 山田千草, 金田浩明, 吉田真子, 武上茂彦, 小西敦子, 北出達也

「卵黄ホスファチジルコリンを界面活性剤としたイオン液体ナノ粒子の調製と粒子形成の多核 NMR 解析」

第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会

平成 28 年 10 月 15 日

大阪薬科大学 (大阪)

⑩ 武上茂彦, 渡辺暉生, 小西敦子, 北出達也

「イオン液体のナノ粒子形成における ¹H および ¹⁹F NMR 解析」

第 6 回イオン液体討論会

平成 27 年 10 月 26～27 日

同志社大学寒梅館 (京都)

⑪ 山本大輝, 武上茂彦, 成健秀, 足尾大樹, 小西敦子, 北出達也

「¹H-NMR を用いた銅-サイクレン錯体による硫化水素測定法の開発に関する基礎的検討」

第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会

平成 27 年 10 月 17 日

大阪大谷大学 (大阪)

〔図書〕 (計 1 件)

大類洋, 北出達也, 小林典裕, 多賀淳, 武上茂彦, 萩中淳, 山崎和広, 和田昭盛
廣川書店

「薬学機器分析」

2015 年 pp. 24-42, pp. 62-72, pp. 139-149, pp. 259-268, pp. 287-292

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/bunseki/research4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武上 茂彦 (Takegami Shigehiko)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 70298686