

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12511

研究課題名(和文) 痛風の原因となる関節液中の尿酸結晶構造の反磁性リアレンジメント

研究課題名(英文) Diamagnetic rearrangement of uric acid crystal structures causing gout

研究代表者

岩坂 正和 (Iwasaka, Masakazu)

広島大学・ナノデバイス・バイオ融合科学研究所・教授

研究者番号：90243922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：痛風等の原因物質である尿酸の結晶の磁気および光特性を調べることで、痛風の新しい治療・診断法の原理となり得る手法の検討を行った。尿酸結晶の形態に対する磁場作用を調べた。また結晶成長の光学的計測による医療診断を可能とするため、微結晶による光反射と磁場配向特性との関連も調べた。モデル実験系として、尿酸のアモルファス結晶の状態からpH変化で瞬時に板状結晶に構造変化させる手法を開発した。板状結晶が生成すると同時に磁場下での回転運動が起こることを500ミリテスラ磁場下で観測した。尿酸結晶の光反射の異方性は非常に強く、結晶成長および形状の遠隔計測評価のための有用な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Magnetic and optical properties of uric acid crystals initiating gout were investigated for the development of a new possible diagnostics for gout. We studied the effect of magnetic fields on structure of uric acid crystals. In addition, the relation between light reflection by micro-crystals and magnetic orientation was evaluated for the realization of optical diagnostics of crystallization. As a model system, a dynamic change of the crystal structure from amorphous to plate-like crystals was exhibited. Magnetic orientation of the plate-like crystals right after applying a 500 mT magnetic field was observed. The observed distinct anisotropy of uric acid crystals is useful for the remote detection of the uric acid crystallization and its shape.

研究分野：生体磁気工学

キーワード：磁場配向 尿酸結晶 反磁性 痛風 結晶構造 光反射 光計測

## 1. 研究開始当初の背景

近年増加しているさまざまな生活習慣病に対し、治療法および治療薬の研究・開発が行われており、特に注目を集めているのは、生活習慣の乱れにより生じる痛風・尿路結石である。痛風は体内に存在する尿酸の血中濃度の増加が原因で関節に炎症をもたらす病気である。原因物質である尿酸は、細胞内核酸からプリン体、ヒポキサンチン、キサンチンを経て生成される。このような体内代謝の流れで尿酸は生産され、最終的に体外へ排出される。しかし一部は体内に再吸収され、再吸収により尿酸が体内で多量蓄積されると、針状結晶化して関節に析出する。この結晶を異物として体外排除するため、好中球が捕食する。捕食活動の激化や活動中に死んだ好中球の影響によって関節炎を生じ、痛風と認識される。一方、尿路結石は尿酸に加え、尿中シュウ酸濃度が増加して結石が生じることが原因で、わき腹・背中側に激痛の発作が生じる病気である。この結晶の成因は複雑で未解明な点が多いが、一般的には体質・生活習慣の乱れから高シュウ酸尿症となることが直接的原因とされている。痛風・尿路結石は民間療法として、水等の飲用による利尿作用での尿酸・結石の自然排出により予防していたが、脱水症状による悪化・尿酸結石発生等の欠点があった。最近では尿酸合成阻害薬や排石剤といった治療薬が開発されているが、副作用などの問題が指摘されており、尿路結石では衝撃波による結石粉碎治療も存在するが、大きな結石は粉碎不可能で痛みも伴う治療である。そこでわれわれは、新たな治療法を確立するため痛風や尿路結石の原因物質である尿酸・シュウ酸結晶の形状を磁氣的に改変または磁気マニピュレーションすることを目標とした。

## 2. 研究の目的

本研究は、尿酸結晶およびシュウ酸結晶のかたちを磁氣的にコントロールする手法を明らかにすることを最終目標とする。針状の尿酸結晶の析出を極力抑え、「角の取れた丸い」尿酸結晶が析出する磁場印加法の構築・シュウ酸結晶の成長を阻害し、尿路中結石の排出を促すための結晶磁気マニピュレーション開発を目指す。その基礎的知見を得るため、強磁場下での結晶生成、回転磁石による反磁性磁気トルク方向変化を用いた結晶形状遠隔制御に取り組む。結晶成長の阻害条件を定量的に解析するため、結晶内のナノスケール構造に対する磁場効果を計測可能な実験系を構築する。回転永久磁石による反磁性磁気トルク方向変化が結晶成長速度・結晶形態と配向特性に与える効果について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル実験系の構築

尿酸結晶およびシュウ酸結晶作成条件の検討を進めた。尿酸の濃度条件を制御し、pHや温度などの結晶化条件を設定した。溶液系内部での尿酸結晶析出の方法として、薄層の空間に飽和濃度の尿酸水溶液を設置し、pHおよび温度を変化させることで尿酸結晶を析出させる方法を検討した。外部との液体交換可能なチャンバーを作成し、酸/アルカリ水溶液の注入・交換によってpHを変化させつつ、尿酸結晶の析出プロセスを制御した。同様の手法で、シュウ酸結晶作成条件の模索・結晶作成手法を検討した。

### (2) 尿酸結晶の構造解析および磁場中での結晶化による結晶形状変化の観察

得られた尿酸結晶の水溶液中での構造解析を行った。暗視野照明における光反射特性の磁気応答をもとに、板状結晶と針状結晶のエッジの光計測の可能性を調べた。また、結晶構造が変化するプロセスを開発し、その結晶変態プロセスでのX線構造解析を行い、X線構造解析データベースとの比較を行うことで構造変化を考察した。

### (3) グアニン結晶の特性との比較

グアニン結晶(尿酸の類似物質)との比較を行った。尿酸結晶とグアニン結晶とで磁場配向を起こす閾値と磁場応答メカニズムを考察し、光反射による尿酸結晶ナノアレンジメント評価法の原理を検討した。磁場配向観測により尿酸結晶の反磁性磁化率異方性を調べ、天然グアニン結晶の磁場配向挙動との比較を行った。

### (4) 患部モデルを用いた結晶形成・結晶溶解の磁気制御

関節の隙間を模倣した薄層内で、対流を誘起しつつ尿酸結晶の形成と結晶溶解の観察を磁場の有無で比較し、磁場が誘起する対流と磁気回転運動、常磁性液体と水、反磁性結晶の磁化率勾配による磁気力の効果を調べた。500mTの磁場を発生する電磁石、回転する永久磁石による300mTの擬似的な回転磁場下、および5T直流磁場(超伝導磁石による)を用いた。

また、患部モデルとして、体表にグアニン結晶アレンジメント(配列パターン)を有する深海魚(ヨコエソ)を用い、そのグアニン結晶凝集体にNaOH水溶液を添加しつつ磁場を印加し溶解状態の評価を行った。

## 4. 研究成果

モデル実験系として主に尿酸結晶での迅速な結晶形成と溶解に対する物理的效果を評価するのに最適な実験条件を定めた。尿酸の濃度条件を制御し、pHなどの結晶化条件を設定した。溶液系内部で微結晶が再結晶化する過

程での磁場印加が、結晶の形状に及ぼす効果を顕微鏡観察で評価した。

超伝導磁石 (5 テスラ) および最大 500mT の強磁場を発生する電磁石を用い、磁場発生空間内部に設置した磁場中顕微鏡 (~1000 倍の倍率) で磁気応答の検出を行った。ファイバーアタッチメントを用いた分光計測を用い、微結晶の形態変化過程をクロスニコル透過偏光 (複屈折) で評価した。5T あるいは 500mT 磁場の有無での、再結晶化した微粒子の形態および透過偏光の比較を行った。

強塩基の NaOH 水溶液に高濃度の尿酸を分散させミセル化させた状態から pH を中性に移行させることで、ほぼ瞬時に板状結晶を形成させることが可能となった。

また、尿酸結晶の結晶変態・構造変化の際の光反射変化の観察を行った (図 1)。磁場印加とともにこの微結晶が回転する際の光反射強度変化は、結晶形成進行の評価に有用であると考えられる。尿酸結晶の磁気応答の解明のためには、尿酸分子と類似した分子構造をもつグアニン結晶 (魚類の色素胞から得られる) が、人体内痛風誘因結晶のモデルとして有用であることに注目した。そこで、グアニン結晶の磁場下での光反射計測手法を展開させ、痛風のモデル物質である魚類体表のグアニン結晶において、結晶面に対する光入射方向によって光反射強度が顕著に変化することを明らかにした (図 2)。この光反射の結晶面における異方性は、尿酸結晶のマクロ構造にも適用可能であることが示唆された。

尿酸の結晶化過程に強磁場を印加することで、ミセル化水溶液が流動状態であり、かつ微結晶が数 10 マイクロメートルのサイズに凝集した状態でも、微結晶凝集体内部で板状結晶の配向をそろえることが可能であった。また、透過偏光計測により、ナノスケールでの微結晶の配向方向変化の検出に成功した。さらに、ミセル状態にある微結晶と板状 (および針状) 結晶化直後の結晶化浮遊サスペンションを磁場中で X 線構造解析した。ミセル状態では微結晶はアモルファス化しており、再結晶化過程では Na 塩結晶を含みつつ磁場配向していることが明らかとなった。

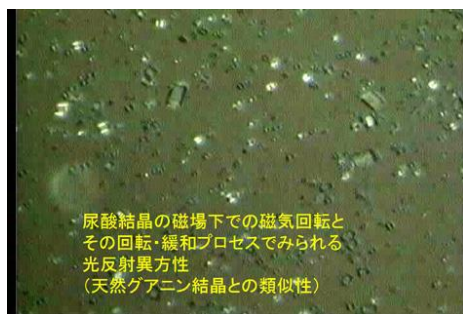


図 1 尿酸板状結晶が磁場下で回転する際に見られた光反射変化

痛風の患部モデルとして、体表にグアニン結晶凝集塊を有する深海魚 (ヨコエソ) を用い、結晶に NaOH 水溶液を添加した場合の磁場の有無による溶解状態への影響を調べた (図 3)。この深海魚は、2016 年 5 月に広島大学の練習船豊潮丸の実験航海で採取したサンプルの中の 5 個体を利用した (船上で水揚げ後、冷凍保存して実験室に運び、解凍した魚体で実施した)。黒色の体表の上に存在する環状のグアニン結晶配列の部分に 0.01M~0.1M の NaOH 水溶液を添加した際、結晶凝集塊は数 10 秒以内に溶けて消滅した。この過程に 500mT の直流磁場を印加した際、この溶解速度が遅延する例が 4 回の試行中 2 回見られた。図 3 (a) では、NaOH 水溶液添加とともに速やかな結晶凝集塊の溶解が見られた。一方、あらかじめ磁場を印加した状態で NaOH 水溶液を添加した場合、結晶凝集塊の溶解は見られないか遅延した。500mT の直流磁場による磁場配向が、結晶溶解の際は抑制性の刺激として作用したか、あるいは結晶が溶解しつつ再結晶化する挙動を起こしていれば Na 塩結晶に置き換わる際に磁場配向が結晶成長を促進することで溶解が阻害され可能性も考えられる。尿酸結晶でも同様の効果が存在するかどうかは今後の課題とした。

次に、回転磁場下での尿酸結晶溶解の評価を行った。あらかじめ再結晶化した尿酸板状結晶の濃厚サスペンションに対し最終濃度が  $10^{-7}M \sim 10^{-5}M$  の NaOH 存在下の溶解刺激を与え、さらに、500mT 磁場下での振動刺激あるいは静置した尿酸結晶含有ファントムに対する 300mT 回転磁場 (回転永久磁石) の磁気トルク作用を与えた。いずれも関節の隙間を模倣した薄層内に沈殿した板状尿酸結晶に対して刺激作用を与え、その上澄み水溶液の吸光度変化 (600nm) で評価した。NaOH の濃度別での約 1 分間の回転磁場 (あるいは磁場下振動) を与えた前後の吸光度を表 1 に示す。吸光度測定の際は、刺激後 30 秒間静置した後、採取した上澄みを再度攪拌し光学測定セルに移して吸光度計 (BeckmanDU640) で測定を行った。NaOH 添加での尿酸板状結晶溶解による結晶塊の分解が、機械的振動および 300mT~500mT 磁場によって速くなる傾向が見られたが、有意な差は得られなかった。

最後に 100mT-60Hz 交流磁場を与えた場合、および 500mT 磁場下で結晶収容容器を約 90 度回転させた場合の挙動観察を行った。交流磁場下では微結晶の挙動を反射光測光で評価し、磁場変化に追従する動きが高感度検出できた。その挙動を高速度カメラで観察し、3つの結晶軸に沿った反磁性磁化率の分布を解析し、2つの磁化容易軸が存在することを考察した。

痛風誘発微結晶の形態変化に関する今回の研究の結果、数 100mT 程度の磁場では結晶形成制御は困難であると結論できる。一方で、微結晶配向検出を高感度に光計測することは、今後の痛風誘発結晶の診断計測に有効である

可能性が示唆された。今回の計測では主に可視光を用いた磁場下回転運動評価を行った。今後、近赤外光を用いることで、関節患部での結晶状態の評価が可能になることが期待される。

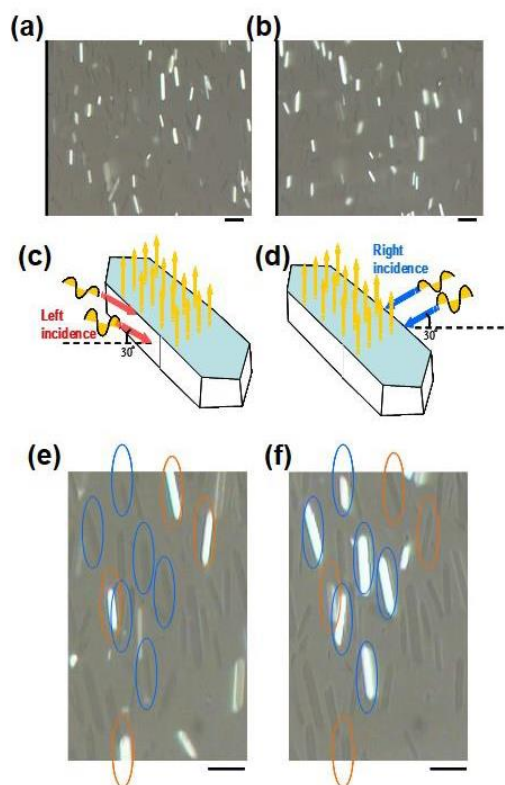


図2 痛風のモデル物質である魚類体表のグアニン結晶において、結晶面に対する光入射方向に依存した光反射強度変化

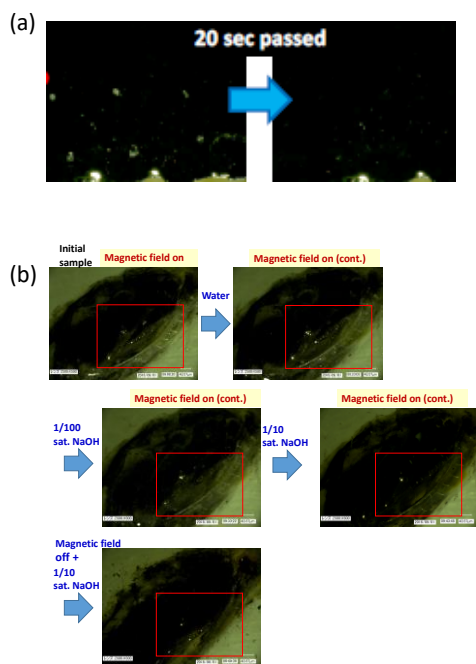


図3 尿酸類似分子であるグアニン結晶凝集塊に NaOH 水溶液を添加した場合の磁場の有無による溶解状態への影響（深海魚ヨコエソの体表の結晶塊に対して実施）

表1 尿酸結晶含有ファントムに対する変動磁場作用の評価例

300mT 回転磁場			
NaOH濃度(最終M)	刺激前 Abs(600)	磁場印加後 Abs(600)	n=5 対照群(印加なし) Abs(600)
$2 \times 10^5$	$0.005 \pm 0.002$	$0.093 \pm 0.015$	$0.085 \pm 0.020$
$2 \times 10^6$	$0.008 \pm 0.005$	$0.048 \pm 0.010$	$0.040 \pm 0.028$
$1 \times 10^7$	$0.010 \pm 0.006$	$0.025 \pm 0.008$	$0.030 \pm 0.012$

500mT磁場下振動(2Hz)			
NaOH濃度(最終M)	刺激前 Abs(600)	磁場印加後 Abs(600)	n=6 対照群(振動のみ) Abs(600)
$2 \times 10^5$	$0.007 \pm 0.005$	$0.103 \pm 0.009$	$0.091 \pm 0.012$
$2 \times 10^6$	$0.011 \pm 0.010$	$0.060 \pm 0.018$	$0.056 \pm 0.007$
$1 \times 10^7$	$0.014 \pm 0.011$	$0.020 \pm 0.013$	$0.024 \pm 0.009$

## 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 4 件)

- ① Masakazu Iwasaka, Yuri Mizukawa, and Nicholas W. Roberts, Magnetic Control of the Light Reflection Anisotropy in a Biogenic Guanine Microcrystal Platelet, *Langmuir*, 2016, 32 (1), pp 180-187, DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03522 (査読有り)
- ② Y. Takeuchi and M. Iwasaka, Detection of Monosodium Urate Crystals for Gout Diagnosis using Magnetic Fields and Near-infrared Light, *IEEE Transactions on Magnetics*, 2016, 52 (7), 2529061(1-4), 10.1109/TMAG.2016.2529061 (査読有り)
- ③ Y. Takeuchi and M. Iwasaka, Effects of magnetic fields on dissolution of arthritis causing crystals, *Journal of Applied Physics*, 2015, 117 (17), 17D152 (1-4), dx.doi.org/10.1063/1.4919037 (査読有り)
- ④ M. Iwasaka and Y. Mizukawa, Effects of magnetic fields on the convection of biogenic guanine crystals in aqueous solution, *Journal of Applied Physics*, 2015, 117 (17), 17E127 (1-4), dx.doi.org/10.1063/1.4917330 (査読有り)

[学会発表] (計 14 件)

- ① Y. Mizukawa, M. Iwasaka and S. Ohtsuka, Deep-sea fish skin as a model for developing magnetic treatments of gout, 61st Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials, OCTOBER 31 - NOVEMBER 4, 2016, NEW ORLEANS, LOUISIANA, U. S. A.
- ② Y. Mizukawa, M. Iwasaka and S. Ohtsuka, Magneto-biomimetic analysis of fish iris efficiency for assisting eyes in human, 61st Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials, OCTOBER 31 - NOVEMBER 4, 2016, NEW ORLEANS, LOUISIANA, U. S. A.

- ③ 高根澤雄大, 柏木裕晴, 岩坂正和, ヒラメ眼および体表におけるバイオリフレクター結晶の光特性と磁場効果, 電気学会マグネティックス研究会, 2016年3月8日, 仙台市青葉 東北大学工学部, 仙台
- ④ Y. Takeuchi and M. Iwasaka, Measurement of the Monosodium Urate Crystals using the Magnetic Fields and Near-infrared Light for Gout Diagnosis, MMM/INtermag 2016 Joint Conference, 2016年1月11日~15日, San Diego, California, U.S.A.
- ⑤ M. Iwasaka, Bio-mimic magnetic light control by uric acid crystals in firefly bioluminescence, MMM/INtermag 2016 Joint Conference, 2016年1月11日~15日, San Diego, California, U.S.A.
- ⑥ M. Iwasaka, Magneto-light scattering determination of alignment direction in meso- to micro-scale objects, MMM/INtermag 2016 Joint Conference, 2016年1月11日~15日, San Diego, California, U.S.A.
- ⑦ M. Iwasaka and H. Asada, Observation of the competing magnetic torque forces in dia and strong-magnetic thin film conjugate at 300 mT, MMM/INtermag 2016 Joint Conference, 2016年1月11日~15日, San Diego, California, U.S.A.
- ⑧ 高根澤雄大, 岩坂正和, ヒラメ体表パターンに対する光刺激および磁場効果の基礎的検討, 第38回日本生体医工学会中国四国支部大会, 2015年11月28日, 広島市立大学, 広島
- ⑨ 柏木裕晴, 岩坂正和, メダカ眼底のグアニン結晶リフレクターの光反射および磁場配向, 第38回日本生体医工学会中国四国支部大会, 2015年11月28日, 広島市立大学, 広島
- ⑩ 岩坂正和, 生体由来微結晶の磁気応答とバイオフォトニクス, 第8回 ChemBio ハイブリッドレクチャー (東京大学大学院工学研究科化学生命工学専攻) (招待講演), 2015年10月3日, 東京大学, 東京
- ⑪ Y. Mizukawa and M. Iwasaka, Optical Change Property in Micro-inclination of Light-reflection Surface of Biogenic Guanine Crystals under Magnetic Field, 応用物理学会 学術講演会 (招待講演), 2015年9月14日, 名古屋国際会議場, 名古屋
- ⑫ M. Iwasaka, Control of Light Scattering in Biogenic Micro-Crystals by Diamagnetic Rotation, 応用物理学会 学術講演会, 2015年9月13日, 名古屋国際会議場, 名古屋
- ⑬ 岩坂正和, 生体関連の反磁性微結晶に対する磁場効果, 第30回生体磁気学会大会,

2015年6月5日, 大雪クリスタルホール, 北海道, 旭川

- ⑭ 水川友里, 岩坂正和, 反磁性核酸塩基結晶による磁気マイクロミラーの制御, 第30回生体磁気学会大会, 2015年6月4日, 大雪クリスタルホール, 北海道, 旭川

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://iwasaka.server-shared.com/houga\\_ua.html](http://iwasaka.server-shared.com/houga_ua.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩坂 正和 (IWASAKA, Masakazu)

広島大学ナノデバイス・バイオ融合科学研究所・教授

研究者番号 : 90243922