

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19073

研究課題名(和文)磁気ナノ微粒子の優れたイオン化支援機能の探求と質量分析イメージングへの応用

研究課題名(英文) Ionization assist ability of magnetic nanoparticles and application for mass spectrometric imaging

研究代表者

一柳 優子 (Ichiyangi, Yuko)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：90240762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ナノメートルサイズの磁気微粒子を作製し、その微粒子を質量分析MALDI-TOF-MSシステムのマトリックスとして機能するか否かを検討した。鉄の酸化物を主とした試料の他、光触媒にヒントを得てチタン酸化物TiO₂にアミノ基を修飾した機能性ナノ微粒子を作製した。作製したナノ微粒子は優れたイオン化支援機能を持ち、従来はスペクトル取得が困難とされていた、低分子物質をも検出可能であることが明らかになった。標準的な検体に対しても、市販のマトリックスと比較して、高い分解能で検出することができた。膵がんに関連する糖質(GalCer)や、肝臓病の原因の1つと考えられる物質も検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すい臓がんなどは発見が非常に難しい上に進行が早く、原因や発症する傾向さえもわかっていない難治性癌として知られている。原因解明への新たな分析手法を開発することが望まれる。本研究により磁気ナノ微粒子を用いて、従来では検出不可能であった質量領域におけるイオン化を実現させるとともに、質量分析スペクトルの高分解能化をはかる。磁気ナノ微粒子の物性や、イオン化のメカニズムなどを究明する物理工学の基礎研究を基盤とし、これまでほとんど接点の無かった病理研究分野へ新たなアプローチを提案する。

研究成果の概要(英文)：Magnetic nanoparticles were prepared by original wet method. The particles were farther developed as new matrix by modification for MALDI-TOF-MS system. We have detected small molecular analytes such as colchicin and aspirin using our developed functional nanoparticles. These analytes were normally hard to detect because of their very small molecules. We have successfully detected glycolipids associated with pancreatic cancer. Materials concerning with liver disease were also detected.

研究分野：ナノ磁性

キーワード：磁性体 イオン化支援能 質量分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昨今、世界的に物理、化学、バイオの各専門分野においてナノレベルでの研究が要求されつつある。医療の分野では生体組織や細胞内物質の分析が必要であり、その一手法として質量分析法(MALDI-TOF-MS)が挙げられる。この手法のマトリックスとなるイオン化支援剤にコバルト微粒子を用いて島津製作所の田中氏がノーベル賞を獲得している。近年ではこの質量分析がバイオ分野で活発に用いられるようになった(Matthew L et al. *Nature* 481, 2012)。報告者は独自の製法で、コバルト同様の遷移金属を含んだ種々のナノ微粒子を生成してきた(特許第 3933366 号)が、このうち鉄酸化物を主成分とした粒径が約 3.7nm のマコーレート鉱物型ナノ微粒子についてイオン化支援マトリックス剤として質量分析を試みたところ、S/N 比が高く、また低分子の薬剤や高分子のインシュリンまで検出できる、優れたイオン化支援機能を持つことを発見した。これらの結果をふまえ、がん細胞の分析など病理の分野における応用の着想に至った。

2. 研究の目的

国立がんセンターの発表でも明らかのように、すい臓がんなどは発見が非常に難しい上に進行が早く、原因や発症する傾向さえもわかっていない難治性癌として知られている。原因解明への新たな分析手法も求められる。本研究では磁気ナノ微粒子を用いて、従来では検出不可能であった質量領域におけるイオン化を実現させるとともに、質量分析スペクトルの高分解能化をはかる。さらにはがん細胞の高解像度の質量分析イメージングを実現し、がんの原因となる物質とその分布を明らかにし、新たな病理分析方法を提案する。優れたイオン化支援機能を持つ磁気ナノ微粒子を開発し、高分解能で革新的な生体組織の分析と分布を同時に実現する。磁気ナノ微粒子の物性や、イオン化のメカニズムなどを究明する物理工学の基礎研究を基盤とし、これまでほとんど接点の無かった病理研究分野へ新たなアプローチを提案し、飛躍的な医療技術の発展を目指す。

3. 研究の方法

(1)イオン化支援機能を持つ、ナノ微粒子の作製とマトリックス試料の最適化

これまでに、鉄酸化物を中心とした微粒子が、イオン化支援機能を持つことがわかった。鉄(Fe)に代わる他の 3d 遷移金属を含む微粒子を作製する。報告者独自の製法により作製した微粒子は、SiO₂ に包含されているが、SiO₂ 包含されているものと無いものを作製して比較する。初期実験ではアミノ基を修飾したものが、高いイオン化支援機能を持つことを見出した。アミノ基以外の修飾物や複数種類の修飾も試みる。また微粒子を覆う SiO₂ の厚みによるイオン化の違いも検討する余地がある。最適化した磁気微粒子をマトリックスとして、以下の 4 項目に目標を絞り、イオン化メカニズムの解明と、膵癌細胞に関する物質の質量分析に挑戦する。肝臓がんなど他の難治性癌にも挑戦する。

(2) がん細胞の培養

当研究室のラボでは乳がん細胞を培養が可能な設備と技術を昨年より整えることができていたため、既存の設備を利用して、膵癌や肝癌の細胞を培養する方針である。正常細胞の培養は容易ではないと言われているが、正常細胞も扱えるように整えていきたい。膵癌細胞については、膵癌が専門である富山大学の井村教授から、肝臓細胞については、徳島大学の常山教授から助言をいただく。

(3)微粒子の物性評価とイオン化のメカニズムの考察

イオン化のメカニズムは未だに明らかにされていない。メカニズム究明のために、微粒子について、吸光スペクトル、赤外線スペクトル、局所構造解析などの分析を行い、特性を明らかにした上で考察する。

(4)膵・肝臓がん細胞に関する質量スペクトルの検出

構築した技術を用いて、膵癌細胞の質量分析を行う。最近ガラクトシルセラミド(GalCer)という糖質が高濃度で存在することがわかってきた。(*J Immunol* 168, 2002) そこで、特にこの GalCer に注目し、分子量 820(M/w)付近のスペクトルを高分解能で得ることを目標にする。

4. 研究成果

・TiO₂ 微粒子を使ったマトリックス

イオン化支援機能を持つ磁気ナノ微粒子を作製するために、先行研究で見いだした鉄の酸化物に他元素をドーピングすることを試みた。3 d 遷移金属のドーピングではあまり効率のよい結果が得られなかったため、光触媒にヒントを得てチタン酸化物 TiO₂ にアミノ基を修飾した機能性ナノ微粒子の作製に取り組んだ。その結果、粒径約 3 nm 程度の単相のアナターゼ型 TiO₂ であることが確認された。

本微粒子のイオン化支援機能を確認するため、検体として薬剤であるアスピリン(MW=180.2)、コルヒチン(MW=399.4)を選んだ。そしてマトリックスとして作製したナノ微粒子と市販のマトリックス CHCA(*-cyano-4-hydroxycinnamic acid*)を用いて質量分析(MS)スペクトルを比較した。その結果、全ての検体の MS 測定の結果より、従来のマトリックスでは MS スペクトルの検出が出来ず、今回開発した SiO₂ 包含 TiO₂ ナノ微粒子とアミノ基を修飾したものでは MS スペクトルを得ることができた。マトリックスを加えない場合は、検体は検出できなかった。

さらに、SiO₂ を除去したものでは MS スペクトルが得られないことがわかった。このことから、

イオン化支援機能は SiO₂ 層が関係していることが新たに明らかになった。図 1 にコルヒチンを検体として、質量分析したスペクトルを示す。上から no matrix, 市販のマトリックス CHCA を使用した場合、そして本 TiO₂ ナノ微粒子、本微粒子に SiO₂ を含むもの、さらにアミノ基を修飾したものを使用した場合である。S/N 比を見ると、従来のマトリックスとは比較にならないほど、精度が良いことがわかる。マトリックスが無い場合は、全く検出できない。

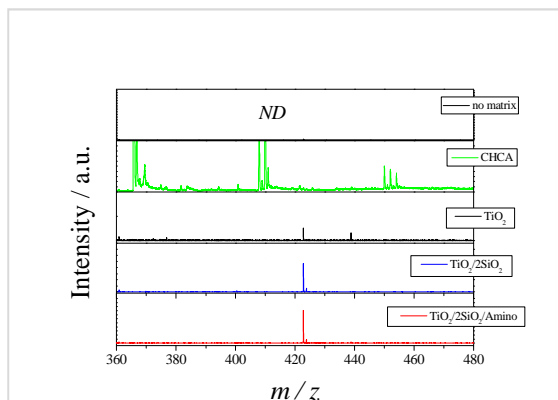


図 1 . コルヒチン(MW=399.4)+Na=422.4 の質量分析スペクトル。上からマトリックス無し、市販の CHCA, 本微粒子 TiO₂, TiO₂/SiO₂ 包含、アミノ基も修飾したものをマトリックスとして使用。

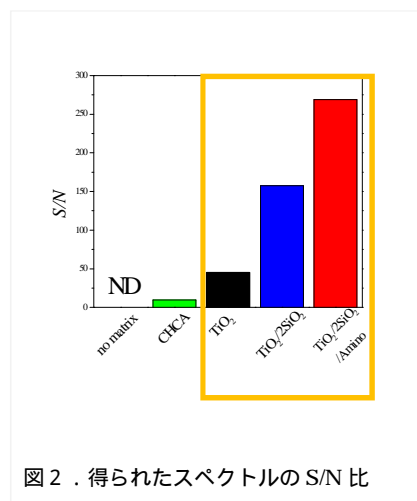


図 2 . 得られたスペクトルの S/N 比

・ SiO₂ 包含ニッケルフェライト(NiFe₂O₄)微粒子

前述のマトリックスの別候補として、SiO₂ 包含 NiFe₂O₄ 微粒子を作製し、イオン化支援能力を検討した。コルヒチン、アスピリンを検体とした場合は、前述のマトリックスと同様に、アミノ基を修飾して機能化したもので、特に明瞭なスペクトルの検出と高い S/N 比を得ることができた。さらに、非常に低い分子量である L-cysteine (M/w=121.1)の検出を試みたところ、なおもスペクトルを検出することができた。ここで、Colchicine, L-cysteine の構造に注目してイオン化のメカニズムに関する考察を行うと、C-N 結合が関係していることが示唆される。C-N 結合は C-S 結合に次いで結合エネルギーが低く、293 kJ/mol である。結合エネルギーの低さがイオン化を促進していることも考えられる。

・ 膵がん細胞の質量分析とイメージング

膵癌に糖脂質の一種であるガラクトシルセラミド(GalCer)が特異的に出現するという報告があったが、分子量 850.8(M/w)の GalCer を明瞭に検出することができた。膵がん細胞について、かなり広範囲にわたり、網羅的にスペクトルを得る試みをした。AXPC, BXPC, KPIN, KP3 の 4 種類の細胞について、スペクトルを分析してみたところ、m/z=800 付近に違いが見られるようであった。GalCer に注目し、GalCer(GC とする)18 (M/w 750.6), GC22 (M/w 806.6), GC24 (M/w 878.8)それぞれのスペクトルに注目し、イメージングを試みた。全体的に GC が分布していることが確認できた。KP3 上には GC18 が存在しない、などの興味深い結果が得られた。詳細の情報についてはさらなる分析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuko Ichiyanagi	4. 巻 6-7
2. 論文標題 Characterization and theranostics application of pluralistic ferrite nanoparticles	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Material Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 68-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4172/2169-0022-C1-079	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 6件／うち国際学会 13件）

1. 発表者名 Y. Sahashi, K. Yoda, T. Ide, K. Fujiwara, A. Oshima, K. Kanda, Y. Ito, Y. Takahashi and Y. Ichiyanagi
2. 発表標題 Particle size control and ionization assist ability of CoFe ₂ O ₄ nanoparticles surrounded by SiO ₂
3. 学会等名 12th International Symposium on Nanomedicine（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Ichiyanagi
2. 発表標題 Functional magnetic nanoparticles for theranostics
3. 学会等名 7th World Congress and Expo on Nanotechnology and Materials Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Ichiyanagi
2. 発表標題 Functional Magnetic Nanoparticles as Theranostic Agents
3. 学会等名 12th International Symposium on Nanomedicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐橋侑馬, 伊藤勇毅, 井手太星, 藤原康暉, 大嶋晃人, 神田康平, 一柳優子
2. 発表標題 磁気ナノ微粒子のイオン化支援機能
3. 学会等名 第54回熱測定討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本達哉, 井手太星, 藤原康暉, 相原大輝, 大嶋晃人, 神田康平, 一柳優子
2. 発表標題 CoFe ₂ O ₄ /SiO ₂ ナノ微粒子のSiO ₂ 層の変化によるMRI造影効果とイオン化支援機能
3. 学会等名 応用物理学会 2017 秋季学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相原大輝, 依田浩平, 藤原康暉, 井手太星, 橋本達哉, 大嶋晃人, 神田康平, 一柳優子
2. 発表標題 SiO ₂ 包含Coフェライトナノ微粒子の粒径制御とイオン化支援機能
3. 学会等名 日本物理学会 2017 秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 D. Aihara, K. Yoda, K. Fujiwara, T. Ide, T. Hashimoto, A. Oshima, K. Kanda, Y. Ichianagi
2. 発表標題 Particle size control and ionization assist ability of CoFe ₂ O ₄ nanoparticles surrounded by SiO ₂
3. 学会等名 International Symposium on Nanomedcin (11th ISNM) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hashimoto T. Ide, K. Fujiwara, D. Aihara, A. Oshima, K. Kanda, T. Y. Hosokai, A. Usui, Y. Ichiyanagi
2. 発表標題 Enhancement of MRI contrast and ionization ability of CoFe ₂ O ₄ / SiO ₂ nanoparticles depending on the amount of SiO ₂
3. 学会等名 International Symposium on Nanomedicine (11th ISNM) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koki Fujiwara, Shinji Kimura, Shunta Miyano, Taisei Ide, Yoshiyuki Hosokai, Akihito Usui, and Yuko Ichiyanagi
2. 発表標題 Structural analysis and suppression of Jahn-Teller distortion in Cu-ferrite nanoparticles surrounded by amorphous SiO ₂ for biomedical application
3. 学会等名 Atomic Level Characterization (ALC'17) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Ide, K. Fujiwara, T. Hashimoto, K. Kanda, D. Aihara, A. Oshima and Y. Ichiyanagi,
2. 発表標題 Ferromagnetic behavior and electronic characterization of ZnO nanoparticles for imaging probes
3. 学会等名 Atomic Level Characterization (ALC'17) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kota Aoki
2. 発表標題 " Ionization Ability of Functional Magnetic Nanoparticles and Gold Nanoparticles "
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kota Aoki, Yuko Ichiyanagi
2. 発表標題 Ionization Assisting Ability of Plasmonic Particles and Magnetic Nanoparticles as Matrices for Mass Spectrometry”
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木 孝太, 大嶋 晃人, 神田 康平, 児玉 慶太, 梨本 健太郎, 濱田 颯太, 一柳 優子
2. 発表標題 機能化した磁気ナノ微粒子とプラズモニック粒子のイオン化支援機能
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Ichiyanagi
2. 発表標題 Magnetic nanoparticles for diagnostics and therapies
3. 学会等名 7th China-Japan symposium on nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Ichiyanagi
2. 発表標題 Magnetic nanoparticles toward to the diagnostics and therapies
3. 学会等名 Nanomaterials: Applications & Properties, Ukraine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Ichiyanagi
2. 発表標題 Local Structure Analysis of Magnetic Nanoparticles and Application for Theranostics
3. 学会等名 6th International Conference on Theoretical, Materials and Condensed Matter Physics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Ichiyanagi
2. 発表標題 Cell Selective Magnetic Nanoparticles for Theranostics
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考