

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500409

研究課題名（和文） 有機シリカ粒子技術による革新的マルチモーダル

イメージングプローブの開発

研究課題名（英文） Development of innovative multimodal imaging probes using

organosilica particle technology

研究代表者

中村 教泰（NAKAMURA MICHIIRO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10314858

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者が世界に先駆けて開発した有機シリカ粒子技術を駆使して新規なイメージングプローブの開発を行った。in vitro 並びに in vivo 蛍光イメージング、X線CT、MRIなどに応用可能な新規なプローブの作製に成功した。さらに一つのプローブで蛍光観察とMRI観察など複数観察が可能なマルチモーダルイメージングプローブの作製にも成功した。マウスを用いた生体イメージングにおいても腫瘍組織の検出など有用な所見を得ることができた。生物医学研究に有用な革新的マルチモーダルイメージングプローブの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed novel imaging probes using organosilica particle technology. We prepared various kinds of imaging probes, and they were useful for in vitro and in vivo fluorescent imaging, X-ray computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) and so on. Furthermore we also developed multimodal imaging probes for imaging that combine fluorescent imaging, X-ray CT, and MRI. The imaging probes were useful for various applications such as in vivo detections of tumor tissue of mouse. Useful innovative multimodal imaging probes for biomedical studies were developed successfully.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：イメージング、ナノ粒子、蛍光、有機シリカ、マルチモダリティー

1. 研究開始当初の背景

生体内の分子や細胞を可視化し、生体機能を観察するイメージング技術の発展が期待されている。イメージングにおいて対象物を可視化するためのプローブは極めて重要で

ある。ナノ粒子をイメージングのためのプローブとして応用する研究はナノテクノロジーの進展並びに、ナノ医療への期待から、近年、活発に進められている。ナノ粒子は化学分子と比較して高機能化と多機能化が可能

である。一つのナノ粒子で X 線 CT や MRI など多種のイメージングに応用可能なマルチモーダルイメージングプローブはイメージングに革新的な効果をもたらすことができる。

2. 研究の目的

申請者が世界に先駆けて開発し展開を進めている「有機シリカ粒子技術」を駆使して一つの粒子でマクロレベルからミクロレベル、ナノレベルの観察が可能であると共に、マクロにおいて X 線 CT や MRI など多種のイメージングを同時に可能とする新規な「革新的マルチモーダルイメージングプローブ」を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、有機シリカ粒子技術を用いて (1) シングルモーダルイメージングプローブの開発と評価、(2) マルチモーダルイメージングプローブの開発と評価のため研究開発を進めた。有機シリカ粒子技術を駆使し、(1)では有機色素や機能性粒子をドーピング法、組み込み法、層状被覆法にて粒子を機能化しシングルモーダルイメージングプローブを作製した。(2)では(1)で得られた粒子をもとに層状被覆法などを用いてさらなる多機能化を行い、マルチモーダルイメージングプローブを作製した。蛍光イメージングでは蛍光分光光度計、蛍光顕微鏡、in vivo 蛍光イメージング装置、マルチズーム蛍光顕微鏡、X 線 CT では動物用 X 線 CT 装置、MRI では 1.5T と 3T の装置にて作製した粒子の評価を行った。さらにマウスを用いた生体イメージングも行った。

4. 研究成果

(1) シングルモーダルイメージングプローブの開発と評価

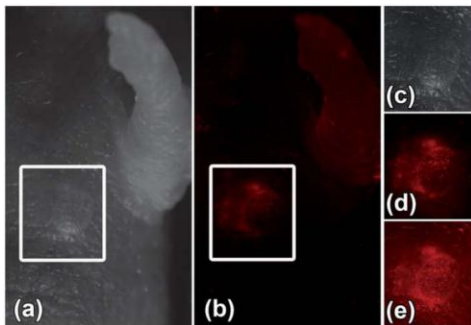


図 1. in vivo 蛍光イメージング(標識細胞)

蛍光有機シリカ粒子で標識した細胞をマウスに皮下注射し観察した。注入部位は明視野(a,c)にて隆起が認められ、蛍光観察(b,d)にて標識細胞の蛍光が観察できた。また可視光・蛍光同時観察(e)も可能であった。

① 近赤外線蛍光: 近赤外線蛍光をもつイメージングが可能な 3 種類のナノ粒子の作製に成功していた。蛍光波長は約 660~760 nm

であり、多重近赤外線蛍光イメージングも可能であった。粒子サイズは 50 nm から 200 nm の粒子の作製にも成功した。マウス生体内においての粒子の蛍光が確認できた(図 1)。

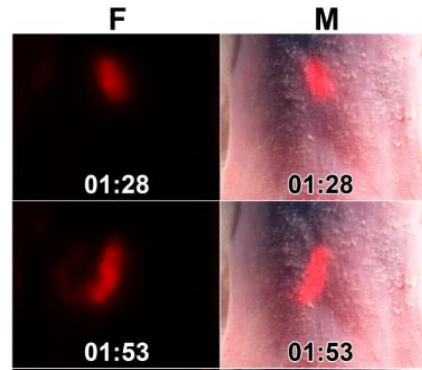


図 2. in vivo 蛍光イメージング(腸管運動)
蛍光有機シリカ粒子を経口投与し腹部の蛍光観察(F)を行った。(M)腹部の明視野所見と重ねている。経時的な蛍光シグナルの移動が観察できた。

近赤外線蛍光観察において体外からの腸管運動の観察(図 2)などの生体機能の可視化に成功した。また腫瘍を移植したマウスにおいて腫瘍への粒子の集積を確認することができた(図 3)。

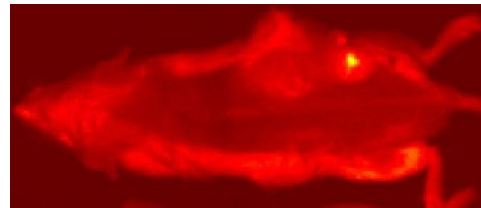


図 3 in vivo 蛍光イメージング(腫瘍検出)
蛍光有機シリカ粒子を経静脈投与した。右下背部に強い蛍光が観察できた。

② X 線 CT: 金ナノ粒子を被覆した有機シリカ層に多様な蛍光機能を付加させることに成功した。またヨード化合物を含有する粒子の作製に成功した。また近赤外線蛍光とのマルチモーダル化に成功した。粒子の経口投与により粒子の腸管内での分布の変化を X 線 CT にて観察することができた。

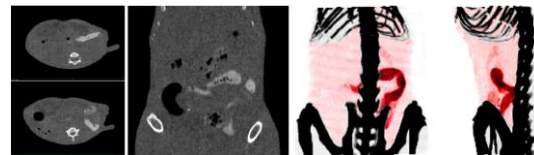


図 4. X 線 CT (消化管造影)

粒子(A)は T1 強調にて陽性造影、T2 強調にて陰性造影、粒子(B)は T1 強調、T2 強調ともに陰性造影が可能なナノ粒子である。

③ MRI: T1 強調において陽性シグナルを持つ粒子の作製を検討した。T1 強調において陽性シグナルを持つ粒子の作製に成功した。また酸化鉄粒子を用いない T2 強調造影用の粒

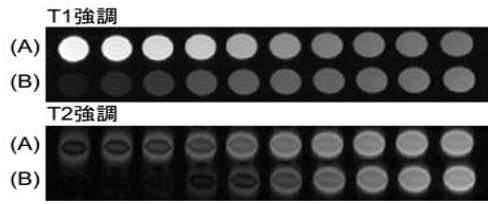


図 5. MRI (新規な MRI プローブ粒子の作製)
 粒子(A)は T1 強調にて陽性造影、T2 強調にて陰性造影、粒子(B)は T1 強調、T2 強調ともに陰性造影が可能なナノ粒子である。

子の作製を検討し成功した。各粒子を 3 テスラの MRI にて評価を行ったところ特徴的なシグナル特性を示した(図 5)。さらに T1 強調において陽性シグナルを持つ粒子をマウスに経静脈投与を行い MRI にて観察し、造影効果を確認することができた(図 6)。

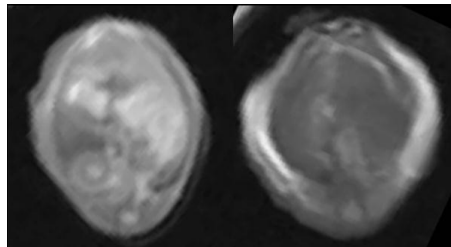


図 6. MRI (T1 強調・陽性粒子による造影)
 マウスに T1 強調・陽性粒子の経静脈投与を行い MRI 撮影を行った(左)。コントロールの肝臓と比較して白く造影されている。

④ PET:粒子表面に PET 用の核種を結合させるため、1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetra-acetic acid(DOTA)などのキレート剤の検討を進めた。粒子表面にキレート剤を結合した後、ガドリニウムを反応させ MRI・T1 強調にて陽性シグナルを認めた。DOTA の粒子表面への結合により、PET 用の核種の結合が可能である。

(2) マルチモーダルイメージングプローブの開発と評価

作製に成功したシングルモーダルイメージングプローブを基に有機シリカ粒子の多機能化能を活用しマルチモーダルイメージングプローブの作製を行った。図 7 では蛍光イメージングと X 線 CT によるマルチモーダルイメージングの所見を示した。粒子内にヨード化合物による X 線吸収特性と近赤外線蛍光特性を付加した粒子を用いたものである。腸管内の粒子の蛍光が体外から明確に検出できたと共に X 線 CT において粒子の消化管内での分布の定量的観察が可能であった。腹部における蛍光と X 線 CT のイメージング所見の相関の検討が可能であった。

さらに蛍光イメージングと MRI の観察が可能なマルチモーダルイメージングプローブ

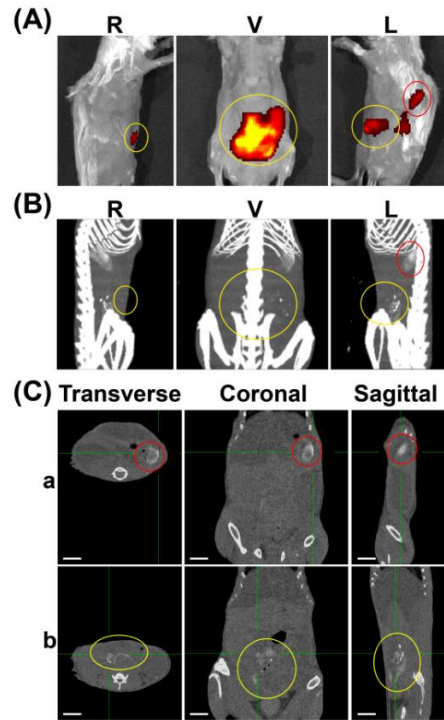


図 7. マルチモーダルイメージング (蛍光と X 線 CT)
 有機シリカ粒子の蛍光が各方向から観察できた(A)。また X 線 CT では三次元画像(B)、断層像にて(C)にて粒子の位置の評価が可能であった。

の作製を検討した。T2 強調・陽性粒子に蛍光機能の付加に成功し、生体イメージングに応用した。マウスに投与し肝臓を観察したところ、粒子の蛍光イメージングにより、肝臓の組織構造が確認できた。MRI にて肝臓のシグナルの変化が確認できた。また肝臓癌を持つ LEC ラットに投与したところ、蛍光イメージングにて肝臓の正常の組織像と比較して組織構造の乱れが確認できた。さらに MRI で肝臓内の腫瘍の造影像の確認に成功した(図 8)。さらに T1 強調・陽性粒子において蛍光機能の付加にも成功しており、多様なマルチモーダルイメージングによる観察が可能となった。さらに蛍光、X 線 CT、MRI、PET 兼用が可能な粒子の作製にも成功しており、高度なマルチモーダルイメージングが可能な革新的なプローブ並びにその作製の基盤技術が確立できた。

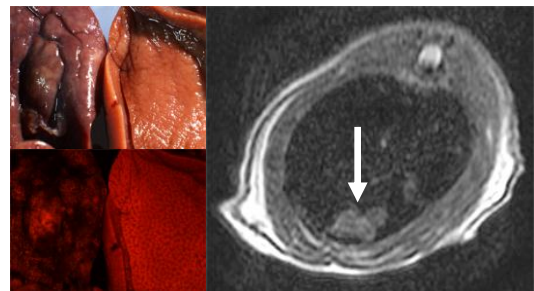


図 8. 肝臓病変の蛍光イメージングと MRI
 右図: 正常の肝臓(右)と比較して病変を持つ肝臓(左)では不均一な蛍光所見などが観察できた。左図: 病変を持つ肝臓の MRI 所見。肝臓が観察できた(白矢印)。

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 12 件)

- (1) Nakamura M, Miyamoto K, Hayashi K, Awaad A, Ochiai M, Ishimura K. (2012) Time-lapse fluorescence imaging and quantitative single cell and endosomal analysis of peritoneal macrophages using fluorescent organosilica nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*, 査読有。 in press
- (2) Hayashi K, Nakamura M, Miki H, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T, Ishimura K. (2012) Near-Infrared Fluorescent Silica/Porphyrin Hybrid Nanorings for In Vivo Cancer Imaging. *Advanced Functional Materials*, 査読有。 in press
DOI:10.1002/adfm.201200219
- (3) Awaad A, Nakamura M, Ishimura K. (2012) Imaging of size dependent uptake and identification of novel pathway in mouse Peyer's patches using fluorescent organosilica particles. *Nanomedicine: NBM*, 査読有。 in press
DOI:10.1016/j.nano.2011.08.009
- (4) Awaad A, Nakamura M, Ishimura K. (2012) Histochemical and biochemical analysis of the size-dependent nano-immunoreponse in mouse Peyer's patches using fluorescent organosilica particles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1423-1439. 査読有。
DOI: 10.2147/IJN.S28675
- (5) Nakamura M, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T, Ishimura K. (2011) One-pot synthesis and characterization of dual fluorescent thiol-organosilica nanoparticles as non-photoblinking quantum dots and their applications for biological imaging. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 4689-4695. 査読有。
DOI:10.1039/C0JM04259E
- (6) Hayashi K, Nakamura M, Ishimura K. (2011) In situ synthesis and photoresponsive rupture of organosilica nanocapsules, *Chemical Communications*, 47, 1518-1520. 査読有。
DOI: 10.1039/c2cc17444h
- (7) Hayashi K, Nakamura M, Sakamoto W, Yogo T, Kori T, Ishimura K. (2011) Formation of sea urchin-like hierarchical nanostructures of tio2 by enzyme-mediated self-assembly for destruction of macrophages. *Chemistry of Materials*, 23, 14, 3341-3347. 査読有。
DOI: 10.1021/cm200826c

- (8) Hayashi K, Nakamura M, Makita Y, Fujiwara R, Kori T, Ishimura K. (2011) Synthesis and photocatalytic activity of sea urchin-shaped rutile TiO₂ nanocrystals. *Materials Letters*, 65, 3037-3040. 査読有。
DOI:10.1016/j.matlet.2011.06.044
- (9) Nakamura M, Ozaki S, Abe M, Doi H, Matsumoto T, Ishimura K. (2010) Size-controlled synthesis, surface functionalization, and biological applications of thiol-organosilica particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 79, 19-26. 査読有。
DOI:10.1016/j.colsurfb.2010.03.008
- (10) Nakamura M, Ishimura K. (2010) Rapid size evaluation of nanoparticles using flow cytometry. *Advanced Science Letters*, 3 (2) 130-137. 査読有。
DOI:10.1166/asl.2010.1096
- (11) Miyoshi H, Imura H, Nakamura M. (2010) Control of emission peaks of x-ray phosphor using dye-silica nanoparticles, *Journal of luminescence*, 130, 404-410. 査読有。
DOI:10.1016/j.jlumin.2009.10.004
- (12) 中村教泰、石村和敬 (2010) 新規な有機シリカナノ粒子の作製と光線力学的治療への応用. *日本レーザー医学会誌*, 30 (4), 394-398. 査読有。

[学会発表] (計 23 件)

- (1) Kanadani T, (2011/12/20) Quantitative single cell analysis of macrophages using fluorescent organosilica nanoparticles surface-modified with polyethylene glycol. The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems Conference, (Hawaii, USA)
- (2) Nakamura M, (2011/12/20) Preparation of novel multifunctionalized nanoparticles for multimodal DDI using organosilica particles technology. The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems Conference, (Hawaii, USA)
- (3) Awaad A, (2011/12/18) Imaging of size dependent uptake and identification of novel pathway in mouse Peyer's patches using fluorescent organosilica particles. The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems Conference, (Hawaii, USA)
- (4) 太田傑, (2011/11/27) 酸化鉄粒子を用いた新規MRI用プローブ開発における緩和時間特性の評価、平成23年度中四国放射線医療技術フォーラム、米子コンベンションセンター (米子市)

(5) 橋本英樹, (2011/11/11-13) シリカをコーティングした酸化亜鉛微粒子の発光特性、第9回医用分光学会、島根大学生物資源科学部1号館 (松江市)

(6) 中村教泰, (2011/10/28) 新規な有機シリカ・マルチモーダル分子イメージング用ナノ粒子、JST イノベーションサテライト徳島・研究成果報告会、ホテルクレメント徳島 (徳島市)

(7) 中村教泰, (2011/9/22) 新規なマルチモーダル分子イメージング用ナノ粒子、イノベーション・ジャパン 2011-大学見本市・「新技術説明会」、東京国際フォーラム (有楽町)

(8) 中村教泰, (2011/9/21-22) 新規なマルチモーダル分子イメージング用ナノ粒子、イノベーション・ジャパン 2011-大学見本市・展示会、東京国際フォーラム (有楽町)

(9) 橋本英樹, (2011/6/2-4) シリカをコーティングした酸化亜鉛微粒子の作製、ナノ学会第9回大会、北海道大学・学術交流会館 (札幌市)

(10) 中村教泰, (2011/5/27) 有機シリカ粒子技術を用いた non-photoblinking 量子ドットの作製とユニバーサル多重蛍光イメージング、第6回日本分子イメージング学会総会・学術集会、神戸国際会議場 (神戸市)

(11) 中村教泰, (2011/3/30) 解剖学・生理学モデル講義「組織学総論・血液」、第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 パシフィコ横浜会議センター (横浜市)

(12) Nakamura M, (2011/3/30) Histological analysis and multimodal imaging using multifunctionalized organosilica nanoparticles. 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 パシフィコ横浜会議センター (横浜市)

(13) 林幸彦朗, (2011/3/17) 光線力学療法のためのウニ状酸化チタンナノ構造体の合成、日本セラミックス協会年会、静岡大学浜松キャンパス (浜松市)

(14) Nakamura M, (2010/11/16) Preparation of novel multifunctionalized hybrid nanoparticles using organosilica particles technology. 3rd International Congress on Ceramics, Osaka International Convention Center (大阪市)

(15) Hayashi K, (2010/11/15) In-situ template-free synthesis of organosilica nanocapsules. 3rd International Congress on Ceramics, Osaka International Convention Center (大阪市)

(16) Nakamura M, (2010/9/8) Preparation of novel multimodal imaging nanoparticles using organosilica particles technology. 2010 World Molecular Imaging Congress, Kyoto International Conference Center (京

都市)

(17) 中村教泰, (2010/6/18) 有機シリカ粒子技術による多機能ナノ粒子の作製とマルチモーダル DDI、第26回日本 DDS 学会、大阪国際交流センター (大阪市)

(18) 中村教泰, (2010/5/22) 有機シリカ粒子技術による新規なマルチモーダルイメージングナノ粒子の作製、日本分子イメージング学会 第5回 学会総会・学術集会、ピアザ淡海 (滋賀県大津市)

(19) Nakamura M, (2010/1/22) Organosilica particles technology as a novel surface processing for magnet particles. 11th Joint MMM/Intermag Conference, Marriott Washington Wardman Park, (DC, US)

(20) 中村教泰, (2009/10/31) 有機シリカ粒子技術を用いた新規なマルチモーダルイメージングプローブの開発、第47回日本生物物理学会年会、アスティとくしま (徳島市)

(21) 中村教泰, (2009/9/16) 有機シリカ粒子技術を用いた新規なハイブリッド多機能ナノ粒子の作製、日本セラミックス協会 第22回秋季シンポジウム、愛媛大学城北地区 (松山市)

(22) 中村教泰, (2009/9/12) 磁性粒子の新たな表面加工技術としての有機シリカ粒子技術、第33回日本磁気学会学術講演会、長崎大学文教キャンパス (長崎市)

(23) 中村教泰, (2009/6/26) マルチモーダル標的分子を検出する多機能有機シリカナノ粒子の創製、第13回日本がん分子標的治療学会学術集会、ホテルクレメント徳島 (徳島市)

[図書] (計1件)

(1) Nakamura M. (2009) Approaches to biofunctionalization of spherical silica nanomaterials, in Nanomaterials for the Life Sciences, Vol. 2: Nonmagnetic Inorganic Nanomaterials (Ed.: C. S. S. R. Kumar), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 109-161.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)
名称: NANOFUNCTIONAL SILICA PARTICLES AND MANUFACTURING METHOD THEREOF.
発明者: 中村教泰
権利者: 徳島大学
種類: 特許
番号: WO/2009/072657
出願年月日: 2009年6月11日
国内外の別: 国外

○取得状況 (計3件)

名称：標的生体分子標識用もしくは標的細胞標識用の蛍光シリカ粒子組成物、及びこれを用いたフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット

発明者：會澤英樹、大久保典雄、中村教泰、三好弘一

権利者：徳島大学、古河電工株式会社

種類：特許

番号：特許第 4572274 号

取得年月日：2010 年 11 月 4 日

国内外の別：国内

名称：フローサイトメトリーによる細胞の検出・分取システム、及び検出・分取方法

発明者：會澤英樹、大久保典雄、中村教泰、三好弘一

権利者：徳島大学、古河電工株式会社

種類：特許

番号：特許第 4716337 号

取得年月日：2011 年 4 月 8 日

国内外の別：国内

名称：フローサイトメトリーによる生体分子の定量システム、及び定量方法

発明者：會澤英樹、大久保典雄、中村教泰、三好弘一

権利者：徳島大学、古河電工株式会社

種類：特許

番号：特許第 4748542 号

取得年月日：2011 年 5 月 27 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

・所属機関ホームページ

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/kenbikaibou/>

・研究紹介ホームページ

<http://organosilica.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 教泰 (NAKAMURA MICHIHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：10314858

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：