

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 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550112

研究課題名（和文） MRI スペクトロスコピーによる高分子生体材料の非破壊評価法の確立

研究課題名（英文） Non-Destructive Observation of Bio-Polymeric Materials by MRI spectroscopy

研究代表者

黒木 重樹（KUROKI SHIGEKI）

東京工業大学・大学院理工学研究科・特任准教授

研究者番号：30293046

研究成果の概要（和文）: 人体を含めた生体物質を対象とした in Vitro MRI においては、医療診断として用いられることが多いため、形態的情報の取得を特に重視し、分解能の向上とともに、画像のコントラストのつけ方として、 T_1 強調画像、 T_2 強調画像という言葉が示すような定性的な測定法が主流となっている。一方、高分子生体材料などへの MRI 法の応用を考えると単なる形態的情報だけでなく、物性との関連づけの面から、分子レベルの構造および分子運動性の材料全体における空間分布を定性的な議論だけに終わらず、定量的に評価する手法の確立の必要がある。そこで、本研究では高分子生体材料を対象に MRI 法により得られる形態的空間情報に NMR 分光から得られる高分子生体材料中の分子レベルの構造や運動性の違いを付加することにより定量的に評価する方法を開発する。本研究で確立した MRI 法をシルク基盤の小口径人工血管中の水分子の運動性解析に応用した。具体的には、シルク基盤にシルクおよびポリウレタンをコーティングし、コーティング材の異なる人工血管を作製した。これらの人工血管の MRI 画像から、コーティング剤の違いが人工血管中の水分子の緩和時間 T_2 や拡散係数 D の空間分布が大きく影響することがわかった。本研究で開発した定量的 MRI 解析技術により、生体用材料中の局所的な水分子の緩和時間や拡散係数 D を求めることができ、それらの情報から局所的な運動モード（回転、並進）の違いを議論することができた。

研究成果の概要（英文）: The NMR imaging (MRI) method is a useful means for obtaining non-destructively μ -scale spatial information on probe molecules such as water in bulk matter. For this reason, the MRI method has been successfully applied to polymer gel systems. Further, the contrast of images comes from the difference in the ^1H spin density, ^1H spin-spin relaxation time (T_2), and diffusion coefficient (D). Therefore, ^1H MRI method apply non-destructively the information about the amount of water molecules in vascular grafts from the ^1H spin density image and the mobility of water molecules in vascular grafts from the ^1H T_2 and diffusion coefficient (D) images.

In the present study, the spatial distribution of ^1H density, T_2 and diffusion coefficient (D) of water molecules of small-diameter silk fibroin vascular grafts coated with the different materials that is, silk fibroin (SF), polyurethane (PU) in water were observed using ^1H MR imaging and the difference of amount and mobility of water in the layer of the grafts were elucidated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			

総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000
----	-----------	-----------	-----------

研究分野：工学

科研費の分科・細目：ナノテク・材料

キーワード：高分子構造・物性・生体材料・解析・評価・移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

近年、高分子材料を含む多くの新規材料は再生医療などの多くの分野に貢献しており、さらに発展を続けている。これらの生体適合性、強度など必要条件はさまざまな生化学的手法で検討されつつあり、材料評価は新規設計において重要となっている。

しかしながら、これらの材料の評価は主に生化学的手法によるものが多い。効率的かつ高機能なものを新規に作製するにはその分子レベルでの機能解明から新しい材料を製作するのが非常に効率的である。

生化学的手法以外での生体材料の評価としては、材料及び細胞等生体物質を可視化し評価する方法があり、たとえば CT (X 線, MRI, PET など) が用いられている。このうち、MRI は NMR と同じ技術を基盤にしており、X 線や PET に比べると分析化学的要素が多いのが特徴であるが、国内においてはまだ、マイクロ CT を含む X 線 CT が多く用いられているのが現状である。

MRI は X 線 CT では得られにくいと言われている軟組織での非常に小さな差異を明確に得られる可能性が多いことから海外では、特に、軟骨再生材料の評価に用いられている例が報告されている。このように、MRI も再生医療材料の評価に使えることを示されつつあるが、まだ発展途上である。これは、MRI の持っている情報を十分生かしきれていないためであり、分析化学 NMR としての情報を加えることにより、材料評価のための分子レベルでの情報は飛躍的に増加する。

2. 研究の目的

生体材料の MRI から得られる情報を、材料設計に生かせる情報へと結びつける材料評価法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

高分子生体材料を対象に MRI 法により得られる形態的空間情報に NMR 分光から得られる高分子生体材料中の分子レベルの構造や運動性の違いを付加することにより定量的に評価する方法を開発した。具体的には生体材料の MRI から得られる画像情報をもとに、そこからスピン密度、磁気緩和時間、拡散係数等の物理化学的数値を算出し、その空間分布を画像化する手法を確立した。

4. 研究成果

現在市販されている人工血管は、生体反応性の低いポリエステルの組織をひだ状に織つ

たものが主流であるが、それらは主に直径 6 mm 以上の大動脈に用いられることが多く、直径 6 mm 以下の小口径人工血管に関しては、再建術の例は少ない。我々は、絹の分子構造を改変することで、高い生体親和性を兼ね備えた高機能化絹を作製し、それをういた血管再生を誘導する内径 4 mm 以下の抗血栓性人工血管の開発に着手している。

我々は、このシルク基盤の人工血管の生体適合性を議論するうえで、血管への水分子の浸透性および運動性を非破壊で解析できる方法として NMR 顕微鏡が応用できるのではないかと考えた。

通常の医用 MRI では画像の空間分解能およびコントラストに注目が行きがちであるが、MRI の基本となる NMR 分光からは様々な NMR パラメータを得ることができる。例えば、化学シフトからは化学構造、 T_1 , T_2 の磁気緩和時間からは分子レベルの運動性、自己拡散係数 D からは分子の並進運動性が議論できる。MRI からは単なる形態学的情報だけでなく、これらの相互作用パラメータの試料中の空間分布を得ることができる。

ここでは、ベースとなる円筒状のシルク基盤にシルクフィブリンおよびポリウレタンでコーティングを施した人工血管中の含

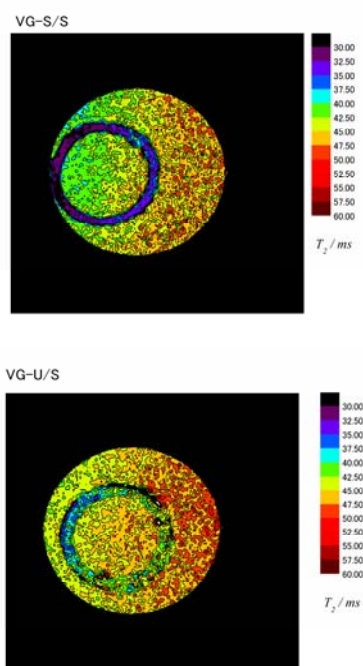


図1 人工血管 VG-S/S 及び VG-U/S の T_2 マップ MRI 画像

水率と水分子の運動性を NMR 顕微鏡で議論した。

人工血管試料として、ダブルラッセル織により作製した円筒状のシルク基盤の内外両側をシルクフィブロインでコーティングした試料 (VG-S/S)、および外側をポリウレタン、内側をシルクフィブロインでコーティングした試料 (VG-U/S) を用いた。電子顕微鏡観察によると、コーティング剤は深くシルク基盤中に浸透していることがわかった。人工血管の外径は 4 mm、厚みは 0.5mm である。

上記のようにして作製した 2 つの人工血管をガラス製外径 8 mm の平底 NMR 試料管中に静置し、精製水で試料管内部を満たした。スピンエコー法を用い、エコー時間 (τ) を 10.97, 21.94, 32.91, 43.88, 54.85, 65.82, 76.79, 87.76, 98.73, 109.7 ms と変化させた 10 枚のスピンエコー画像を測定した。これらの 10 枚の画像から、各々のピクセルのスピン-スピン緩和時間 T_2 が求められ、これを画像化することにより、 T_2 マッピング画像を構築することができる。このようにして得られた T_2 マッピング画像を図 1 に示す。図 1 より人工血管外部のバルク水の T_2 は 45ms であり、両サイドをシルクフィブロインでコーティングした人工血管 VG-S/S 中の水の T_2 は 30 ~ 37.5ms、内側をシルク、外側をポリウレタンでコーティングした人工血管 VG-U/S 中の水の T_2 は 35 ~ 45ms であり、VG-S/S 中の水の T_2 のほうが VG-U/S 中の水の T_2 より小さい。このことから、VG-S/S 中のほうが VG-U/S に比較して水分子の運動性が束縛されていることがわかる。これはコーティング剤として用いたシルク分子と水分子の間の水素結合により、水分子の回転運動が束縛されていることに起因すると考えられる。

一方、さらに強度を徐々に変化させた磁場勾配を印加することにより、水分子の拡散係数 D を求めることができる。本実験では、磁場勾配強度を $G = 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270$ mT / m と変化させて測定された 10 枚のスピンエコー画像から、拡散係数マッピング画像図 2 を構築した。

図 2 より人工血管外部バルクの水の D は 2.0×10^{-9} m²s⁻¹ であり、両サイドをシルクフィブロインでコーティングした人工血管 VG-S/S 中の水の拡散係数 D は $1.5 \sim 1.9 \times 10^{-9}$ m²s⁻¹、内側をシルク、外側をポリウレタンでコーティングした人工血管 VG-S/U 中の水の拡散係数 D は $0.7 \sim 1.3 \times 10^{-9}$ m²s⁻¹ であり、VG-S/U 中の水の拡散係数 D のほうが VG-S/S 中の水の拡散係数 D より小さい。このことは、先に述べた T_2 の結果、VG-S/S 中のほうが VG-S/U 中に比較して水分子の回転運動が束縛されているのとは反対に VG-U/S 中のほうが VG-S/S 中に比較して水分子の並進運動性は束縛されていることがわかる。これは、

VG-U/S ではダブルラッセル織により作製した円筒状のシルク基盤にコーティング剤の

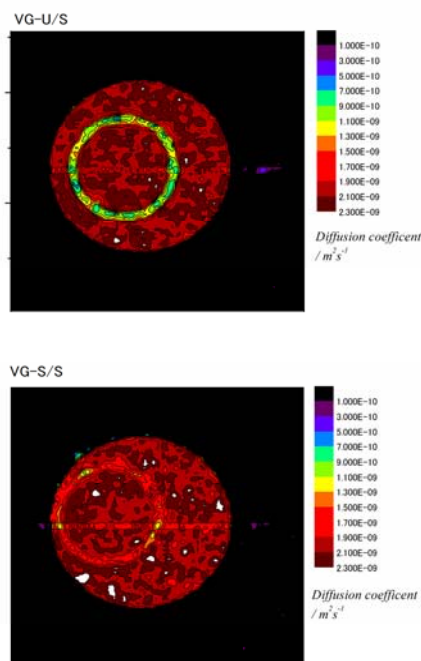


図 2 人工血管 VG-S/S 及び VG-U/S の D マップ MRI 画像

ポリウレタンが浸透しある閉じられた空間を形成することにより、水分子がその閉じられた空間中に閉じ込められ、自由に拡散できず制限拡散が起きていることが示唆される。

このように、緩和時間 T_2 や拡散係数 D の空間分布を得ることにより、異なるモード (回転、並進) の水分子の局所的な運動性を議論することができる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

1. 黒木重樹: *NMR 顕微鏡の高分子材料への応用*; ネットワークポリマー, **33**(3), 160-168(2012). 査読あり
2. S. Kuroki, M. Kanekiyo, K. Yazawa, K. Isobe, T. Asakura: ¹H MRI study of small-diameter silk vascular grafts in water, *Polymer Journal (Tokyo, Japan)* in press. 査読あり
3. S. Kuroki, Y. Nabae, M. Chokai, M. Kakimoto, S. Miyata: Oxygen reduction activity of pyrolysed polypyrroles studied by ¹⁵N solid-state NMR and XPS with Principal Component Analysis,

- Carbon*, **50**, 153-162 (2012). 査読あり
4. M. Hasuike, S. Kuroki, M. Satoh: Double conformational transition of alkali metal poly(g-glutamate)s in aqueous ethanol, *Biophysical Chemistry*, **165-166**, 48-55(2012). 査読あり
 5. Y. Nakazawa, M. Sato, R. Takahashi, D. Aytemiz, C. Takabayashi, T. Tamura, S. Enomoto, M. Sata, T. Asakura: Development of Small-Diameter Vascular Grafts Based on Silk Fibroin Fibers from Bombyx mori for Vascular Regeneration, *J. Biomaterials Sci. Polym. Ed.* **22**(1-3), 195-206 (2011) 査読あり
 6. Y. Nishiyama, Y. Endo, T. Nemoto, H. Utsumi, K. Yamauchi, K. Hioka, T. Asakura, T: Very fast magic angle spinning H-1-N-14 2D solid-state NMR: Sub-micro-liter sample data collection in a few minutes, *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE*, **208**(1), 44-48 (2011) 査読あり
 7. A. Nagano, Y. Tanioka, N. Sakurai, H. Sezutsu, N. Kuboyama, H. Kiba, Y. Tanimoto, N. Nishiyama, T. Asakura: Regeneration of the femoral epicondyle on calcium-binding silk scaffolds developed using transgenic silk fibroin produced by transgenic silkworm, *ACTA BIOMATERIALIA*, **7**(3), 1192-1201 (2011) 査読あり
 8. T. Yagi, M. Sato, Y. Nakazawa, K. Tanaka, M. Sata, K. Itoh, Y. Takagi, T. Asakura: Preparation of double-raschel knitted silk vascular grafts and evaluation of short-term function in a rat abdominal aorta, *JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS*, **14**(2), 89-99 (2011) 査読あり
 9. K. Higa, S. Shimmura, N. Takeshima, F. Moro, T. Kawakita, M. Kasashima, M. Demura, J. Shimazaki, T. Asakura, K. Tsubota: Porous Silk Fibroin Film as a Transparent Carrier for Cultivated Corneal Epithelial Sheets. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **22**(17), 2261-2276 (2011) 査読あり
 10. T. Asakura, R. Koyanagi, N. Nishiyama, N. Kuboyama, H. Kiba, Y. Abiko: Bone regeneration on the epicondyle of the femur supported by silk fibroin-based scaffold: a model system for dental surgery, *Journal of INSECT BIOTECHNOLOGY and SERICOLOGY*, **80**, 25-30 (2011) 査読あり
 11. T. Asakura: The New Silk Road. *Highlighting JAPAN*, **5**(2), 26-27 (2011) 査読あり
 12. T. Asakura, H. Nishi, A. Nagano, A. Yoshida, Y. Nakazawa, M. Kamiya, M. Demura: NMR analysis of the fibronectin cell-adhesive sequence, Arg-Gly-Asp, in a recombinant silk-like protein and a model peptide, *Biomacromolecules*, **12**(11), 3910-3916 (2011) 査読あり
 13. K. Suganuma, K. Horiuchi, H. Matsuda, H.N.Cheng, A. Aoki, T. Asakura: Stereoregularity of Poly(lactic acid) and their Model Compounds as studied by NMR and Quantum Chemical Calculations, *Macromolecules*, **44**(23), 9247-9253 (2011) 査読あり
 14. Y. Inoue, M. Matsui, S. Kuroki, I. Ando: A study of diffusional behavior of polymer having semiflexible main-chain with long n-alkyl side-chains as associated with structural behavior of the side-chains, *J. Mol. Struct.* **976**, 141-149 (2010). 査読あり
 15. M. Nakayama, S. Wada, S. Kuroki, M. Nogami: Factors affecting cyclic durability of all-solid-state lithium polymer batteries using poly(ethylene oxide)-based solid polymer electrolytes, *Energy & Environmental Science*, **3**, 1995-2002 (2010). 査読あり
 16. H. Kimura, H. Dohi, M. Kotani, T. Matsunaga, K. Yamauchi, H. Kaji, H. Kurosu, T. Asakura: Molecular Dynamics and Orientation of Stretched Rubber by Solid-State ¹³C NMR. *Polymer Journal*, **42**(1), 25-30, (2010) 査読あり
 17. S. Enomoto, M. Sumi, K. Kajimoto, Y. Nakazawa, R. Takahashi, C. Takabayashi, T. Asakura, M. Sata: Long-term Patency of Small-diameter Vascular Graft Made

- from Fibroin, a Silk-based Biodegradable Material. *J Vasc Surg.*, 51(1), 155-164, (2010) 査読あり
18. Z. Zhu, Y. Kikuchi, K. Kojima, T. Tamura, N. Kuwabara, T. Nakamura, T. Asakura: Mechanical Properties of Regenerated *Bombyx mori* Silk Fibers and Recombinant Silk Fibers produced by Transgenic Silkworms. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **21**, 395-411, (2010) 査読あり
 19. 青木昭宏, 山崎静夫, 堀口紅実子, 亀谷俊輔, 朝倉哲郎: 水溶液からのポリ(L-アラニン)の凝集構造生成に関する分子動力学計算, 高分子論文集, **67**, 45-50, (2010) 査読あり
 20. 関根素馨, 青木昭宏, 朝倉哲郎: ポリグリコール酸の延伸に伴う構造変化に関する分子動力学計算, ¹³CCP/MASNMR および X線回折による研究, 高分子論文集, **67**, 57-60, (2010) 査読あり
 21. Y. Suzuki, J.T.Gerig, T. Asakura: NMR Study of Interactions between Silk Model Peptide and Fluorinated Alcohols for Preparation of Regenerated Silk Fiber ; *Macromolecules* **43**, 2364-2370 , (2010)
 22. Y. Suzuki, T. Asakura: Local Conformation of Serine Residues in a Silk Model Peptide, (Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)₅ Studied with Solid-State NMR:REDOR, *Polymer Journal*, **42**, 354-356, (2010) 査読あり
 23. R. Koyanagi, Z. Zhenghua, T. Asakura: Regenerated Bombyx mori silk fiber with enhanced biodegradability; *Journal of INSECT BIOTECHNOLOGY and SERICOLOGY*, **79**, 27-30, (2010) 査読あり
 24. K. Yamauchi, S. Yamasaki, R. Takahashi, T. Asakura, Microscopic Structural Analysis of Fractured Silk Fibers from Bombyx mori and Samia cynthia ricini using ¹³C CP/MAS NMR with 1mm micro-coil MAS NMR probehead, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **38**, 27-30, (2010) 査読あり
 25. M. Sato, Y. Nakazawa, R. Takahashi, K. Tanaka, M. Sata, D. Aytemiz, T. Asakura: Small-diameter vascular grafts of Bombyx mori silk fibroin prepared by a combination of electrospinning and sponge coating, *Materials Letters* , **64**, 1786-1788, (2010) 査読あり
 26. Y. Suzuki, A. Aoki, Y. Nakazawa, D. P. Knight, T. Asakura: Structural Analysis of the Synthetic Peptide (Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)₅, a Model for the Crystalline Domain of Bombyx mori Silk Fibroin, Studied with ¹³C CP/MAS NMR, REDOR, and Statistical Mechanical Calculations, *Macromolecules*, **43**, 9434-9440, (2010) 査読あり
 27. M. Hirata, M. Kobayashi, C. Matsumoto, C. Miyaura, T. Asakura, M. Inada: Cell Shape and Matrix Production of Fibroblasts Cultured on Fibroin-organized Silk Scaffold with Type-II β -turn Structured (Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly)_n Sequences, *J. Health Sci.*, **56**(6), 738-744, (2010) 査読あり
- [学会発表](計7件)
1. S. Kuroki, M.Kanekiyo, K. Yazawa, K. Isobe, T. Asakura: MRI Study of vascular grafts base on silk fibroin fibers, ISNMR 2011, November 15-18, 2011 Yokohama.
 2. 鈴木悠, 八木剛仁, 岩井若菜, アルテミズデルヤ, 朝倉哲郎, 中澤靖元, 田中綾, 絹 - ポリウレタン混合材料を基盤とした小口径人工血管の開発, 成形加工シンポジウム'11, 2011/10/15, 秋田大学工学資源学部
 3. Derya Aytemiz, YuSuzuki, Haruki Hayashi, Naoki Nakazumi, Keisuke Takagi, Ryou Tanaka, Satoshi Yamamoto, Hiroyuki Okamoto, Tetsuo Asakura, Preparation of silk fibroin based small-diameter vascular graft and in vivo evaluation, 第60回高分子討論会, 2011/9/30, 岡山大学津島キャンパス
 4. 鈴木悠, アイテミズデルヤ, 羽鳥有希, 阿部康之, 八木剛仁, 高城圭祐, 田中綾, 岡本宏之, 朝倉哲郎, 絹基盤に各種コーティングを施した小口径人工血管の開発, 第60回高分子討論会, 2011/9/30, 岡山大学津島キャンパス
 5. 岩井若菜, 八木剛仁, アルテミズデルヤ, 朝倉哲郎, 中澤靖元, 伊藤健治, 絹ダブルラッセル編み管状構造物へのポリウレタンコーティングによる小口径絹人工血管の作製とinvivo評価, 平成23

年度繊維学会年次大会, 2011/6/8, タワーホール船堀

6. 八木剛仁, アイテミズデリア, 田中綾, 岩井若菜, 山崎静夫, 小松珠実, 鈴木育絵, 中澤靖元, 伊藤健治, 塚谷才英, 朝倉哲郎, 絹-ポリウレタン混合系をコーティング材とするダブルラッセル編み小口径絹人工血管の作製とin vivo評価, 第60回高分子学会年次大会, 2011/5/25, 大阪国際会議場
7. 黒木重樹, 固体¹⁵NMR法を用いた酸素還元活性を有するカーボンアロイ触媒の構造解析, 第48回固体NMR・材料フォーラム及びNIMS計測センターシンポジウム合同研究会, 平成22年10月14, 15日, つくば

〔図書〕(計3件)

1. S. Kuroki, T. Kameda, H. Yasunaga: Applications of nuclear shielding; *Nuclear Magnetic Resonance*, **41**, 56-118 (2012). RSC Publishing, Cambridge, UK.
2. S. Kuroki, S. Matsukawa, H. Yasunaga: Applications of nuclear shielding; *Nuclear Magnetic Resonance*, **40**, 55-133 (2011). RSC Publishing, Cambridge, UK.
3. S. Kuroki, S. Matsukawa, H. Yasunaga: Applications of nuclear shielding; *Nuclear Magnetic Resonance*, **39**, 70-150 (2010). RSC Publishing, Cambridge, UK.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・2009年度

山内 一夫 (YAMAUCHI KAZUO)

東京農工大学・共生科学技術研究科・助教

・2009~2011年度

黒木 重樹 (KUROKI SHIGEKI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・特任准教授

研究者番号: 30293046

(2) 研究分担者

朝倉 哲郎 (ASAKURA TETSUO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究科・教授

研究者番号: 30139208