

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700465

研究課題名（和文）イオン注入法によるマルチモーダルダイヤモンド造影剤の開発

研究課題名（英文）Development of magnetic and optical nanodiamond implanted with paramagnetic ions

研究代表者

森田 将史 (MORITA MASAHITO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：30381594

研究成果の概要（和文）：

単一 Mn⁺イオン注入により、磁場と光に応答するダイヤモンド造影剤(Mn-ND)の合成に成功した。この造影剤をさらに、金ナノ粒子を介して、PEG 付加することで生体環境下での分散性を付与することに成功した。PEG-Au-Mn-ND をマウス尾静脈に注入し、6 時間後と 24 時間後に肝臓造影を行ったところ、T₁ 強調画像でのコントラストが上昇した。肝臓を取り出した後、TEM 画像で確認したところ、金ナノ粒子により、クッパー細胞等に造影剤が取り込まれていることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：

We succeeded in the synthesis of multimodal nanodiamond responded to the magnetic field and visible light. The attachment of gold nanoparticles on the multimodal nanodiamond resulted in the stable disperse in a physiological condition. A mouse liver was visualized 6 and 24 hours later after the administration of this PEG-Au-Mn-ND into mouse tail vein. Further TEM analysis revealed that these hybrid nanomaterials were distributed in liver tissue including Kupper cells. These results imply that the paramagnetic-ion implanted nanodiamond have the potential to be used for long-term in vivo imaging experiments, including cell tracking, metabolic change etc. in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：ナノバイオロジー・ナノメディスン・マルチモーダル造影剤・低侵襲医療

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報が明らかになりつつある現在、再生医療や免疫療法での移植細胞や疾患における異常細胞での重要なバイオマーカー分子の生体内部での時間的、空間的な振舞いを知ることは、治療の効果や病態変動を知るうえで重要である。これまで、プロテオミクスやマイクロアレイなど、システムレベルでの解析からバイオマーカー分子の探索が行われてきたが、こうした分子の、個体レベルにおける実際の動態はほとんど解明されていない。しかし、再生医療や細胞治療を効率的に行うためには、まず生体外から投与した細胞が生体内のどこに位置するか確認し、そのうえ局在部位での生理的機能の発現を低侵襲的手法により分子レベルで確認する必要がある。低侵襲的なラベリング手法としては、超常磁性微粒子(SPIO)を用いたMRIによる方法があるが(Weissleder(2006), 研究業績 12)、この方法で長期に細胞追跡を行うと、鉄微粒子の被膜が分解されて毒を発生し、安全性に問題が生じることが分かってきた。また、生体内での臓器分布が分からないという問題も依然残されている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、投与した細胞の体内動態を臓器レベル、および標的組織での細胞レベルで同時に確認するための、細胞ラベリングプローブを開発することを目指した。とくに、磁場応答性・光応答性・電子線応答性を付与することで、ナノメートルレベルの細胞内小器官の局在が分かる解像度から、生体組織での分布が分かる解像度までの階層的なイメージングを一度に行うことができるように

することで、造影剤の可視化だけでなく、治療応用に展開していくための造影剤開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 試料調整

爆発法で作成されたナノダイヤモンド(ND)(ナノ炭素研究所)をシリコン基盤上に塗布した後、100keVのMn⁺を $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 打ち込んだ(Mn-ND)。その後、アニール処理、空気参加処理を順次施した。合成された磁性NDの物性は、Spring-8での軟X線分光法、硬X線分光法により、それぞれ調べた。

(2) MRI 測定

イオン注入したND(Mn-ND)は、超音波洗浄機で、破碎した後、使用した。マウスでの実験は、11.7T MRI (Bruker 製)を用いて行った。T₁強調画像は、FLASH法を用いた。Mn-NDの生体内での造影能を評価するため、マウス尾静脈から投与し、投与後、6と24時間にMRI撮像を行い、肝臓への移行を調べた。

(3) 軟X線分光

イオン注入後のND内部でのC、およびMnイオンの電子状態を調べるために、L殻励起吸収スペクトルを取得し、注入後の処理条件の検討、および処理後の2価のMnイオンの割合を探ることを目的とした。入射光に水平な面内に光電子分析器と軟X線発光分光器を配置する。光電子分析器は、Au4fを用いた入射光エネルギー補正、及び高次光補正用に用いる。試料面への入射角は斜入射70°に固定する。軟X線発光分光器のエネルギー軸及び分解能調整にはSiO₂鏡面の乱反射スペク

トルを用いる。試料には、 $1 \times 10^{16} / \text{cm}^2$ の Mn イオンを注入した 4nm のナノダイヤモンドND (Mn-ND as impla.) とアニールしたもの (Mn-ND with anneal)、さらにアニール後にさらに空気酸化したものとアニールせずに空気酸化したもの (Mn-ND with anneal +air oxidation) を用いた。サンプルは、 $10 \text{mm}^2 \times 0.5 \text{mm}$ 程度の大きさのペレットとした。これらの試料の Mn L-edge 軟 X 線発光および蛍光スペクトルを、BL27SU を用いて、イオン注入後の処理過程の注入 Mn イオンの電子状態への影響の効果を調べた。測定は室温で行った。

4. 研究成果

単一 Mn⁺イオン注入により、磁場と光に応答するダイヤモンド造影剤(Mn-ND)の合成に成功した。イオン注入後にアニールと空気酸化を施した Mn-ND は、水溶液中への電子線照射により、ほぼ 100%金ナノ粒子を表面上に付加させることができ、チオール化 PEG を簡便に付加させることで、生体環境下でも非常に安定に存在させることに成功した。PEG-Au-Mn-ND をマウス尾静脈に注入し、6 時間後と 24 時間後に肝臓造影を行ったところ、T1 強調画像でのコントラストが上昇した。肝臓を取り出した後、TEM 画像で確認したところ、金ナノ粒子により、クッパー細胞等に造影剤が取り込まれていることが確認できた。このことは、単一ナノダイヤモンド粒子で、nm から cm レベルまでの階層的なマルチモーダルイメージング造影剤になることを意味する。

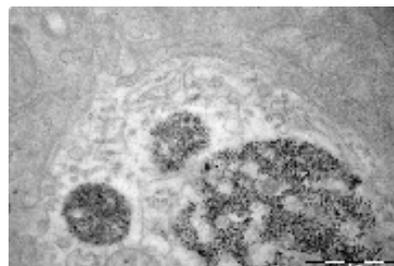


図. PEG 被覆した Au-Mn-ND ハイブリッド粒子をマウス尾静脈から投与して、24 時間後の肝臓の透過電子顕微鏡画像。クッパー細胞への取り込まれている様子が分かる。

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) Takimoto T, Chano T, Shimizu S, Okabe H, Ito M, Morita M, Kimura T, Inubushi T and Komatsu N., Preparation of Fluorescent Diamond Nanoparticles Stably Dispersed under a Physiological Environment through Multistep Organic Transformations. *Chemistry of Materials* 22, 3462-3471, (2010) 査読有
- 2) Tanaka K, Narita A, Kitamura N, Uchiyama W, Morita M, Inubushi T, Chujo Y., Preparation for highly sensitive MRI contrast agents using core/shell type nanoparticles consisting of multiple SPIO cores with thin silica coating. *Langmuir* 26:11759-62, (2010), 査読有
- 3) Kojima H, Mukai Y, Yoshikawa M, Kamei K, Yoshikawa T, Morita M, Inubushi T, Yamamoto TA, Yoshioka Y, Okada N, Seino S, Nakagawa S., Simple PEG conjugation of SPIO via an Au-S bond improves its tumor targeting potency as a novel MR tumor imaging agent. *Bioconjug Chem.*

21:1026-31, (2010), 査読有

- 4) Tanaka, K., Kitamura, N., Naka, K., Morita, M., Inubushi, T., Chujo, M. Nagao, M.; Chujo, Y, Improving Proton Relaxivity of Dendritic MRI Contrast Agents by Rigid Silsesquioxane Core. *Polymer J.* 41, 287-292 (2009), 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Magneto-Optical imaging probes for visualization of dynamic biological responses using MRI/fluorescent imaging., Morita M., “Japan-France Frontiers of Engineering” 1st JFFoE symposium、2010 年 10 月 12 日、グルノーブル・フランス
- 2) Mn-doped nanodiamond for MRI imaging probes., M. Morita, Y Harada, Y Tateyama, S Shin, M Oshima, S Nagamachi, N Komatsu, T Inubushi, Y Yoshioka, Diamond2010, 2010 年 9 月 9 日、ブダペスト・ハンガリー
- 3) 分子・細胞イメージングのためのマルチモーダルイメージング技術、森田将史 , 第 82 回日本生化学会学会シンポジウム, 2009 年 10 月 21 日、神戸
- 4) MRI and MRS for visualization of immune responses, “Frontier Immuno-Imaging” M. Morita International Symposium organized by JST & IFReC, 2009 年 5 月 11 日、大阪

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : MRI 造影剤

発明者 : 森田将史、清野智史、向洋平、中川貴、中川晋作

権利者 : 大阪大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2010-041460

出願年月日 : 平成 22 年 2 月 26 日

国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

<http://biofunc.ifrec.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 森田将史

(Masahito Morita)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号 : 30381594

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :