

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700536
 研究課題名（和文） 細胞動態可視化のための光・磁気共鳴マルチモーダルイメージング技術の開発
 研究課題名（英文） Development of multimodal nanobioprobes for the visualization of cellular dynamics
 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）：

生体外部から細胞移植を行う細胞治療において、その治療効果を調べるために、移植細胞の標的部位での経時的な増殖・分化状態を分子・細胞レベルで低侵襲的に診断するための手法が求められている。というのも、これまでのX線、PET、MRIなどの単一エネルギーの手段では、細胞の位置とその生理的状态など多次元情報を同時に取得することができず、効率的な治療を行うことができなかったからである。そこで本研究では、移植細胞を磁場や光により、細胞を低侵襲的に検出できるダイヤモンドナノ粒子プローブを開発することを目指した。その結果、生体分子と同程度の大きさの金担持磁性・蛍光ナノダイヤモンドを合成できた。

研究成果の概要（英文）：

In immuno-cell therapy and inflammation process during the virus infection and cancer metastasis, it is important to evaluate the physiological function and structural change of transplanted and interested cells *in vivo*. So far, most studies have focused on developing multimodal imaging methods in order to simultaneously detect target cells and analyze their physiological function. In this vein, we have been attempting to develop the stable contrast agents for both MRI with fluorescence imaging. Both imaging modalities have the potential to provide complementary physiological information from micro to macro level, with low invasion compared to PET and X-ray CT. In this project, we succeeded in the synthesis of magnetic and light-responsive contrast agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、マルチモーダルイメージング、細胞動態

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、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。そこで、投与した細胞の体内動態を臓器レベル、標的組織での細胞レベル、および細胞内での小器官レベルという異なる空間スケールで、長期間安定に確認できるための細胞ラベリングプローブを開発することが必要となってくる。

2. 研究の目的

MRIによる細胞ラベリングとして、これまでに、超常磁性鉄微粒子を導入したマイクログリアや神経幹細胞の動態をマウス、ラット脳内で検出することに成功してきた。しかしながら、臨床機として普及し始めた3T以上の高磁場では、非常に強い T_2 短縮効果により、gradient-echo法による高速画像取得が難しく、また大量の鉄分子の T_2 ブロードニング効果により、細胞トラッキングはできても、生体機能の指標となる化合物のMR信号の線幅が広がってしまい、メタボミクスの解析ができなくなってしまう問題点があることも分かった。そこで生体に大量に存在する水分子を利用した細胞内で安定に滞留できる T_1 短縮能を持つナノ粒子や、近赤外蛍光を持つナノ粒子を合成し、生体内での細胞検出や、細胞内での分子局在を長期間可能にするナノ粒子合成を進めてき

た。

これまでに申請者は、ほぼ炭素原子だけからなり、生体適合性が高く、熱伝導性も高いナノ炭素化合物の1種であるナノダイヤモンド(ND)内部に毒性の高い常磁性イオンをイオン注入法により閉じ込める方法により、 T_1 短縮能を持つND MRI造影剤を効率的に合成することに成功してきた。さらに、X線、軟X線分光と第一原理計算による理論解析を組み合わせることで、イオン注入による形成された2つの欠陥とMnが混成してできた[V-Mn-V]構造を効率的に作成することが、 T_1 短縮能を持つ造影剤設計の重要な原理であることを明らかにしてきた。本研究は、これらの成果をもとに、さらにMnNDの生体応用に適した表面修飾法の開発と、蛍光イメージングへの展開をはかるとともに、実際の生体イメージング、細胞イメージングへの応用可能か検証することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) Mn イオン注入爆発法ナノダイヤモンドの合成とマウス MRI イメージング

直径4nmの爆発法NDへMnイオン注入を行い、アニール処理、空気酸化処理を行った。さらに、電子線還元法により金ナノ粒子を担持させた後、そのMRIの T_1 短縮能を T_1 強調画像で、および、電子状態を軟X線吸収分光で確認した。その後、マウス背足部に注射後、膝下リンパ節で集積しているかどうか、 T_1 強調画像を取得した。

(2) 金・蛍光ナノダイヤモンドの合成と蛍光寿命時間

直径20nm以下の高温高圧法NDにHeイオン注入を行った後、アニール処理、空気酸化処理を行い、水溶液中に分散させた。この蛍光ND溶液に、金イオンを混合し、電子線照射を数秒間行い、蛍光ND表面に金ナノ粒子を担持させた。合成した金ナノ粒子担持蛍光NDを、HeLa細胞に投与後、20時間後に、485nmのピコ秒レーザーを照射後、その蛍光強度マップを650nm以上の蛍光を用いて、および蛍光寿命マップをAPD(アバランシェフォトダ

イオード) を持いて測定した。

4. 研究成果

(1) 金ナノ粒子担持処理による T1 短縮効果と電子状態への効果

Mn イオン注入ナノダイヤモンドの分散性制御は、ND のバイオイメージング技術への応用には、重要である。本研究では、金ナノ粒子の生体親和性に注目し、その MnND への担持技術として、電子線還元法を確立した。その結果、T₁ 短縮能を大きく損なうことなく、Mn の電子状態にも影響を与えないことが分かった (図 1)。以上の結果から、金ナノ粒子担持 MnND は、MRI 造影剤として、有用であることが分かった。

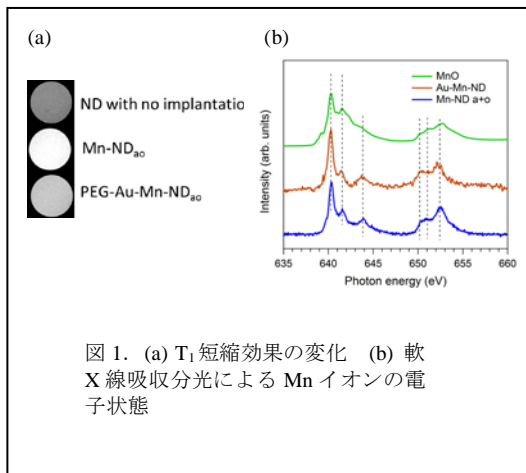


図 1. (a) T₁ 短縮効果の変化 (b) 軟 X 線吸収分光による Mn イオンの電子状態

(2) Au ナノ粒子担持 MnND のリンパ節造影剤としての役割

合成した複合ナノ粒子は、マウス膝下リンパ節造影剤として機能するか検証するため、背足部に金ナノ粒子担持 MnND を投与し、1.5 時間後に T₁ 強調画像を取得し、そのリンパ節への局在を調べた。その結果、リンパ節の一部の信号強度が確認できた。これらの結果は、金ナノ粒子によるプラズモン吸収効果により、視覚的にも確認でき、さらに背足部から、注入したサンプルが除去されていることから、リンパ節へ移行していると結論付けた。さらにサンプル注入部には腫れが見られていないことから、毒性が低いことも確認できた。

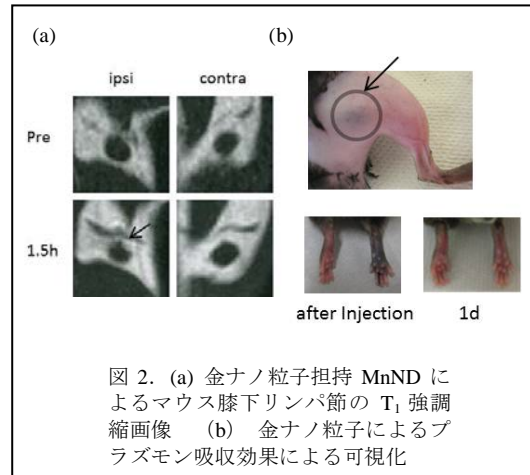


図 2. (a) 金ナノ粒子担持 MnND によるマウス膝下リンパ節の T₁ 強調縮画像 (b) 金ナノ粒子によるプラズモン吸収効果による可視化

(3) Au ナノ粒子担持 MnND のマウス膝下リンパ節造影剤としての役割

金ナノ粒子担持蛍光ナノダイヤモンド投与細胞と蛍光ナノダイヤモンド投与細胞は、蛍光強度マップでは、その細胞内での局在を識別でききないが、蛍光寿命マップでは、識別することができた。

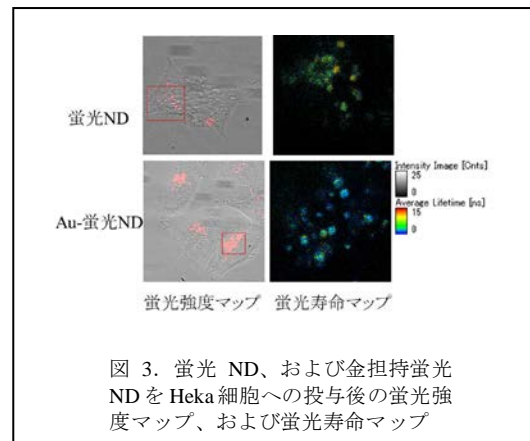


図 3. 蛍光 ND、および金担持蛍光 ND を Heka 細胞への投与後の蛍光強度マップ、および蛍光寿命マップ

さらに、金ナノ粒子担持 ND の細胞内での詳細な分布を調べるため、収差補正電子顕微鏡で局在を調べた。その結果、リソソーム様の細胞内小器官に多くが局在しており、原子分解能レベルで、その構造安定性は維持されていることが確認できた。

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 1 件)

1. Tamenori, Y., Morita, M., and Nakamura, T. Two-dimensional approach to fluorescence yield XANES measurement using a silicon drift detector. *J. Synchrotron Rad.* 18, 747-752 (2011)
査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. ダイヤモンド中磁性不純物欠陥の安定性に関する DFT スピン汚染問題
館山佳尚, 大塚教雄, 原田慈久, 森田将史
日本物理学会 2011 年秋季大会プログラム 2011.9.22 富山
2. Electronic structure calculations on vacancy-manganese center in nanodiamond systems. Takao Otsuka, Yoshitaka Tateyama, Masahito Morita, Makoto Taiji.
XVIth International Workshop on Quantum Systems in Chemistry and Physics. Kanazawa, 2011.9.15

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ダイヤモンド複合粒子
発明者: 森田将史、清野智史、立川貴士、
真嶋哲朗、吉岡芳親
権利者: 大阪大学
種類: 特許権
番号: 特願 2012-246538
出願年月日: 2012. 11. 8
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:

国内外の別:

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

なし

(3) 連携研究者

なし