

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 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791407

研究課題名（和文） マンナン添加超常磁性酸化鉄ナノ粒子を用いた動脈硬化診断法の確立

研究課題名（英文） Diagnostic imaging of atherosclerosis using mannan-coated superparamagnetic iron oxide particles

研究代表者

大谷 秀司 (OTANI HIDEJI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70510270

研究成果の概要（和文）：

核磁気共鳴画像(MRI)を用いた動脈硬化診断において有用性が注目されている微小超常磁性酸化鉄ナノ粒子にマクロファージを標的とした薬物輸送の研究で用いられているマンナンを付加し、有用性を検討した。マンナンデキストラン被覆ナノ鉄粒子、マンナン単独被覆ナノ鉄粒子とともに通常のデキストラン被覆ナノ鉄粒子に比べ、動脈硬化モデルウサギの病変部への取り込み増加、MRI 信号変化の増強が見られ、有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We performed comparative study of mannan-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide(mannan-coated USPIO), mannandextran-coated USPIO, and dextran-coated USPIO in the uptake by the atherosclerotic wall using MRI and histology. Our histological and imaging analyses showed that mannan-coated USPIO and mannandextran-coated USPIO were taken up to a greater degree than dextran-coated USPIO. We suggest that mannan-coated particles are useful for the atherosclerotic imaging.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：微小超常磁性酸化鉄ナノ粒子、MRI 造影剤、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴画像 (MRI) の陰性造影剤として開発された酸化鉄ナノ粒子は、粒子径、表面性状により生体内動態が変化すると言われている。粒子径が50nm 未満の酸化鉄ナノ粒子=微小超常磁性酸化鉄ナノ粒子 (ultrasmall superparamagnetic iron oxide=USPIO) は、粒子径が小さい故に肝臓のクッパー細胞に貪食されにくく血中滞留時間が延長するため、

リンパ系に移行しやすく、欧米ではすでに、MRIでのリンパ節転移の存在診断に用いる造影剤として臨床使用されている。また、動脈硬化の血管壁に存在する、マクロファージにも取り込まれるため、内腔狭窄を来す前の早期動脈硬化病変(血管壁の炎症に伴うマクロファージ活性)の診断への有用性が期待されている。一般に酸化鉄ナノ粒子はデキストラン誘導体水溶液に攪拌・加熱下で塩化第一鉄/

第二鉄混合水溶液を加えた後、精製を行うことで合成され、コア鉄の周りをデキストランでコーティングされている。これに多糖類の一種であるマンナンを付加し、加熱合成した酸化鉄ナノ粒子に我々は注目した。糖鎖認識機構は、肝細胞に存在するアシアロ糖タンパク質レセプターをはじめとして、各種細胞に固有に存在することから、細胞選択的ターゲティングへの応用が期待されている。マンナンは糖鎖認識機構によりマクロファージに選択的に取り込まれやすい多糖類であり、マンナンで表面修飾したものとしていないものでは、動脈硬化血管壁のマクロファージに対する親和性に違いが生じる可能性がある。また、マンナン単独被覆USPIOは、マクロファージへの親和性がより高い可能性がある。

2. 研究の目的

マンナンを添加した微小超常磁性酸化鉄ナノ粒子 (USPIO) を陰性造影剤として用いることにより、動脈硬化の予後予測因子の一つであるマクロファージの多寡をMRIで診断し、より病変に特異性の高い質的診断方法を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) デキストラン被覆 USPIO、マンナンデキストラン被覆 USPIO の比較。

①酸化鉄投与：LDL 受容体の欠損している家族性高コレステロール血症モデルである渡辺遺伝性高脂質血症 (WHHL) ウサギ (神戸大学医学部付属動物施設) を動脈硬化モデルとして用いる。月例 9~11 カ月、計 14 羽。この月齢は、動脈壁のマクロファージが最も多いとされる時期である。デキストラン被覆微小超常磁性酸化鉄粒子と、マンナンデキストラン被覆微小超常磁性酸化鉄粒子を (粒子径：28nm、磁化率：0.028cgs、鉄濃度：約 15mg/ml、提供：名糖産業)、0.008、0.08、0.4、0.8mmol Fe/kg の 3 種の投与量で静脈内

投与する。(それぞれ n=1、n=1、n=1、n=3)。
②MR 撮影：投与 5 日後に、0.8mmol/kg 投与群のみ、in vivo 造影 MR Angiography を行った。犠牲死させ、2.5%グルタルアルデヒド、2%パラフォルムアルデヒドを含む固定液で、灌流固定を行い、大動脈標本を摘出。さらに、2%パラフォルムアルデヒド溶液中で 48 時間浸漬固定する。リン酸緩衝液による洗浄にてパラフォルムアルデヒドを除去したのち、大動脈標本を 50 倍希釈のマグネビスト溶液に浸し、in vitro 標本 MRI を撮像した。MRI は、1.5T MRI (Signa HDxt verigion15 : GE Healthcare) を用いる。撮像法は、3D first spoiled GRASS 法 (efgre3D)、撮像条件は TR=11.8ms、TE=4.1ms、flip angle 30°、FOV5×5 cm、matrix512×512 を使用する。

③血管壁の信号評価：3×20pixelの関心領域を設定し、血管壁の信号雑音比 (SNR) を冠状断の異なる3スライスでそれぞれ3か所測定し、平均値を算出した。投与したUSPIOの種類、投与濃度間での違いを統計学的解析した。(t検定を用い、p<0.05を有意とした。)

④組織学的評価：HE染色、鉄染色 (ペルリブルー染色)、免疫組織化学染色 (RAM11 (マクロファージ) を施行する。

⑤鉄染色陽性部位の算出：200 倍 1 視野における鉄陽性領域面積 (μm^2) を画像解析ソフトウェアにて測定し、ランダムに選んだ3視野の平均値を算出する。鉄染色陽性部位と免疫染色陽性部位 (マクロファージ) を対比する。

⑥鉄含有量定量：ホモジナイズした胸部大動脈標本サンプルのNMR測定を行い、鉄含有量を定量化。予め、磁性ナノ粒子のT2緩和時間を測定し、その粒子が取り込まれた一定重量の生体試料のT2緩和時間も測定。ブランクとして、粒子を投与しない同重量の生体試料もT2緩和時間を測定し、両緩和時間の差と、粒子の緩和時間の比から鉄量を求める。

(2) デキストラン被覆 USPIO、マンナンデキストラン被覆 USPIO、マンナン単独被覆 USPIO の比較。

①酸化鉄投与：WHHL ウサギ9羽(月齢9～11カ月)を使用。平成23年度と同様の手順で実験を施行する。上記3種の酸化鉄ナノ粒子(いずれも粒子径：28nm、磁化率：0.028cgs、鉄濃度：約15mg/ml、提供；名糖産業)を0.8mmol Fe/kgの投与量で静脈内投与する。各群n=3とする。

②～⑤は(1)の2剤の比較と同様に行う。

⑥3種の製剤をマウスマクロファージ培養細胞(J774.1)と一定時間反応させ、細胞への取り込みを比較検討する。

4. 研究成果

(1) デキストラン被覆 USPIO、マンナンデキストラン被覆 USPIO の比較。

血管組織標本の鉄陽性面積は、マンナンデキストラン被覆 USPIO 投与群はデキストラン被覆 USPIO 投与群に比べ、いずれの投与量でも有意に多かった ($p < 0.05$)。また、*in vivo* MRA での血管壁の SNR は製剤投与後低下し、投与前後の SNR の差はマンナンデキストラン被覆 USPIO 投与群が有意に大きかった ($p < 0.05$)。血管標本の SNR は、投与量 0.4、Fe/kg ではマンナンデキストラン被覆 USPIO 投与群の方が、値が低く有意差が見られ ($P < 0.05$)、投与量 0.8mmol Fe/kg でも有意傾向が見られたが、投与量 0.008、0.08mmol Fe/kg では有意差は見られなかった。組織評価で鉄染色陽性部位及び、マクロファージ染色陽性部位はよく一致していた。NMR 測定を用いた血管壁の鉄濃度測定においては、二種の製剤間で有意差は確認できなかった。これは、測定準備段階での標本のホモジネート作業が、線維に富む血管壁では技術的に非常に難しかった点が起因していると考えられる。

(2) デキストラン被覆 USPIO、マンナンデキストラン被覆 USPIO、マンナン単独被覆 USPIO の比較。

鉄陽性面性はデキストラン被覆 USPIO、マンナンデキストラン被覆 USPIO、マンナン単独被覆 USPIO 投与群の後二者で前者より有意に多かった ($p < 0.05$)。*in vivo* MRA で血管壁の SNR は製剤投与後低下し、投与前後の SNR の差は、マンナン単独被覆 USPIO とデキストラン被覆 USPIO の比較では有意差 ($p < 0.05$) が、マンナンデキストラン被覆 USPIO とデキストラン被覆 USPIO では有意傾向が見られ ($p < 0.1$)、2 種のマンナン被覆粒子がより強い血管信号変化を示した。血管標本の SNR は、マンナンデキストラン被覆 USPIO、マンナン単独被覆 USPIO とともにデキストラン被覆 USPIO に比べ値が低く、有意傾向 ($P < 0.1$) が見られた。鉄染色陽性部位及び、マクロファージ染色陽性部位はよく一致していた。培養細胞へ3種の製剤の取り込み比較実験では、細胞内鉄量に有意差は確認されなかった。マンナンを付加したマンナンデキストラン被覆 USPIO とマンナン単独被覆 USPIO はデキストラン被覆 USPIO に比べ、多く動脈硬化血管壁に取り込まれ、MRI での信号変化も強く認められる傾向にあり、動脈硬化病変の診断におけるマンナン付加粒子の有用性が示唆された。但し、マンナン付加方法の異なる2種の製剤間では差は見られず、付加方法による病変感受性向上は確認できなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 土屋 桂子、Evaluation of Atherosclerotic Lesions Using Dextran-coated Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide(D-USPIO) and Mannan Dextran-coated Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide(DM-USPIO)

Particles: Analysis of MR Imaging and
Pathological Findings、北米放射線学会、
2010/11/29、シカゴ、アメリカ

(2)土屋 桂子、Atherosclerotic Imaging Using
4 types of Superparamagnetic Iron Oxides:
New possibilities Using Mannan-coated
Particles、北米放射線学会、2011/11/29、シ
カゴ、アメリカ

6. 研究組織

(1)研究代表者

大谷 秀司 (OTANI HIDEJI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：70510270

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：