

整理番号	2018-J-069	報告者氏名	佐藤和秀
------	------------	-------	------

研究課題名

金属内包カーボンナノチューブで実現する新規ナノイメージング

<代表研究者> 機関名：名古屋大学高等研究院・医学系研究科 職名：S-YLC 特任助教 氏名：佐藤和秀

<共同研究者> 機関名：首都大学東京 職名：理学部 氏名：中西勇介

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

<研究内容>

臨床医学において、イメージングに依る診断・評価は病態の把握、治療法の決定、治療効果計測に必須である。近年、解剖学的なイメージングから病態、病気のみを診断し描出する分子イメージングが新しい分野、方法として知られている。その中でも蛍光を用いたイメージングは、広く細部生物実験や、遺伝子組み換え動物実験などに使用され、今日のバイオ系の研究の礎と成っている。その中でも、近赤外光の1000nmを超える領域はNIR-II領域(第II近赤外光領域)と呼ばれ近年注目を集めている。その特徴は、自家蛍光が極端に少なく、生体深部までの観察が可能であり、1320nmで850nmとくらべて100倍のsignal-noise ratioを得ることができ、インビボイメージングの新領域として期待されている。しかしながら、他の蛍光材料に比較して生体で用いることのできる蛍光材料が不足しているのが現状である。

目的

本研究提案の目的は、世界初の金属(Gd)内包カーボンナノチューブ(CNT)を開発し、その生体適合性修飾を検討し、最終的にはMRI(磁性イメージング)も同時に行えるNIR-IIのイメージング材料としての生体応用を達成する(図2)。MRIを用いたCNTのリアルタイムイメージングのみならず、腫瘍血管の治療によるリアルタイムの変化、吸入イメージングの達成による肺疾患の効果測定へとつなげる。また、革新的治療として報道されている近赤外光線免疫療法の血流このように、自然由来の炭素素材を将来の医学臨床応用、生体応用を見据えたイメージング剤として開発を行う。

<成果等の要約>

上記の目的を達成するために、塩化ガドリニウムを内包したカーボンナノチューブを合成した。TEMやEDXスペクトル分析で内包を確認し、イメージング能をMRI、NIR-IIイメージャーで評価した。生体内での造影能を確認し、特許出願を行った。その後、ヌードマウスにPC-9(肺がん)を左右の臀部に移植し、担癌モデルを作成した。右の腫瘍のみに作成した材料を局注してNIR-IIイメージングとMRIを行い、インビボイメージングを行った。0時間から2時間で観察すると、腫瘍部のNIR-II蛍光と、MRIのT1,T2で陽性造影剤として使用できることが判明した。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

特許出願をはたした。

#特願 2020- 17491 (2020.2.4)(日本)

「金属内包カーボンナノチューブを用いた画像診断新規造影剤」

発明者：~~佐藤和秀~~、中西勇介、永田雅貴、安井裕智、 出願人：名古屋大学

2020年2月4日出願

今後、積極的に学会発表等の公知を行う。

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

背景

臨床医学において、イメージングに依る診断・評価は病態の把握、治療法の決定、治療効果計測に必須である。近年、解剖学的なイメージングから病態、病気のみを診断し描出する分子イメージングが新しい分野、方法として知られている。その中でも蛍光を用いたイメージングは、広く細部生物実験や、遺伝子組み換え動物実験などに使用され、今日のバイオ系の研究の礎と成っている。その中でも、近赤外光の1000nmを超える領域はNIR-II領域(第II近赤外光領域)と呼ばれ近年注目を集めている。その特徴は、自家蛍光が極端に少なく、生体深部までの観察が可能であり、1320nmで850nmとくらべて100倍のsignal-noise ratioを得ることができ、インビボイメージングの新領域として期待されている(図1)。しかしながら、他の蛍光材料に比較して生体で用いることのできる蛍光材料が不足しているのが現状である。

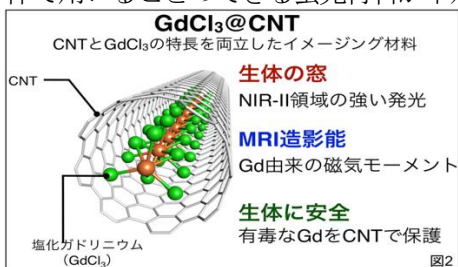


図2 新規材料の特徴

目的

本研究提案の目的は、世界初の金属(Gd)内包カーボンナノチューブ(CNT)を開発し、その生体適合性修飾を検討し、最終的にはMRI(磁性イメージング)も同時に行えるNIR-IIのイメージング材料としての生体応用を達成する(図2)。MRIを用いたCNTのリアルタイムイメージングのみならず、腫瘍血管の治療によるリアルタイムの変化、吸入イメージングの達成による肺疾患の効果測定へとつなげる。また、革新的治療として報道されている近赤外光線免疫療法の血流このように、自然由来の炭素素材を将来の医学臨床応用、生体応用を見据えたイメージング剤として開発を行う。

経過と結果

単層カーボンナノチューブであるMEIJO eDIPS EC1.0(株式会社名城ナノカーボン)を準備した。なお、上記単層カーボンナノチューブの中心直径は1.0nmである。中心直径の数値とは、含有されるカーボンナノチューブの中央値の数値であり、カイラル指数から算出した数値であるが、電子顕微鏡での観測においても同等の数値が確認できる。大気雰囲気下の電気炉にて、単層カーボンナノチューブを6時間かけて500℃まで昇温し、500℃に達した時点で加熱を止めて、室温まで放冷した。この操作は、単層カーボンナノチューブ両端を開くためのものである。室温まで冷却した石英管から生成物を取り出して水洗した。ここでの水洗にて、カーボンナノチューブに関与しなかったGdI₃、及び、カーボンナノチューブに内包されずにカーボンナノチューブの外表面に付着するGdI₃は除去される。水洗後のGd内包カーボンナノチューブを、Gd内包カーボンナノチューブとした。Gd内包カーボンナノチューブにつき、透過型電子顕微鏡(以下、TEMと略することがある。)での観察を行った。製造例1のGd内包カーボンナノチューブのTEM像を図3に示す。

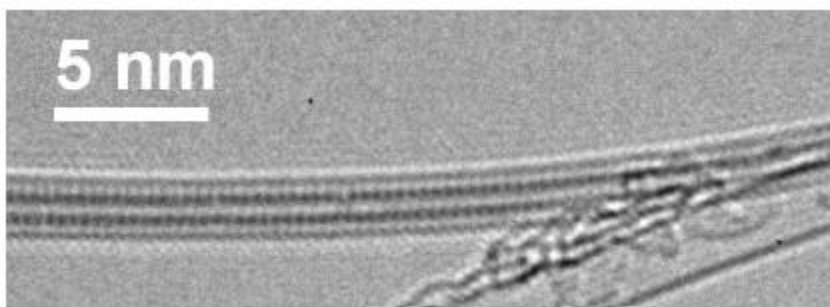


図3 TEM像

図3のTEM像から、Gd内包カーボンナノチューブのいずれにおいても、カーボンナノチューブの内部にGd含有物質が内包されているのが確認できる。カーボンナノチューブの内部でGdが連なったワイヤー状の構造が観察された。

なお、TEM観察によれば、Gd内包カーボンナノチューブのいずれにおいても、存在するカーボンナノチ

チューブのうち、概ね半数のカーボンナノチューブにGd含有物質が内包されていると判断できた。

次に透過型電子顕微鏡にエネルギー分散型X線分析装置を組み合わせたTEM-EDXにて、Gd内包カーボンナノチューブのうち、GdI3含有物質が内包されているのが確認されたカーボンナノチューブについての分析を行った(図4)。その結果、GdI3内包カーボンナノチューブのEDXスペクトルからは、Gd及びC1に由来するピークが観察された。

EDXスペクトル

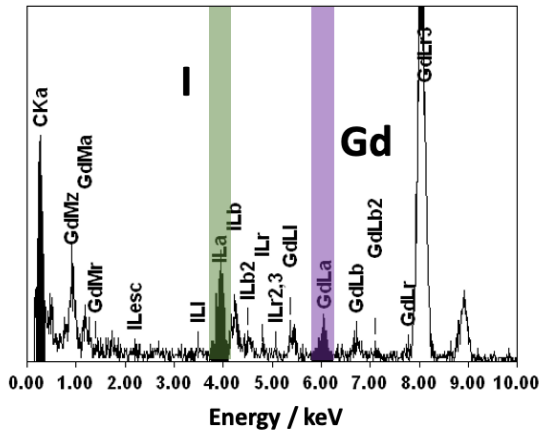


図4 EDX スペクトル

次に、5mgのGd内包カーボンナノチューブと、3mLの1質量%コール酸ナトリウム水溶液を混合し、密閉式超音波分散装置Nanoruptor NR-350(東湘電機株式会社)を用いて、4時間超音波処理することで分散液とした。分散液を分離用小型超遠心機CS100GXL(日立工機株式会社)に供して、52000rpmで1時間、遠心分離をすることで、カーボンナノチューブ凝集体などを沈殿させた。遠心分離処理後の分散液における上部分散液を採取してその後の検討に用いた。

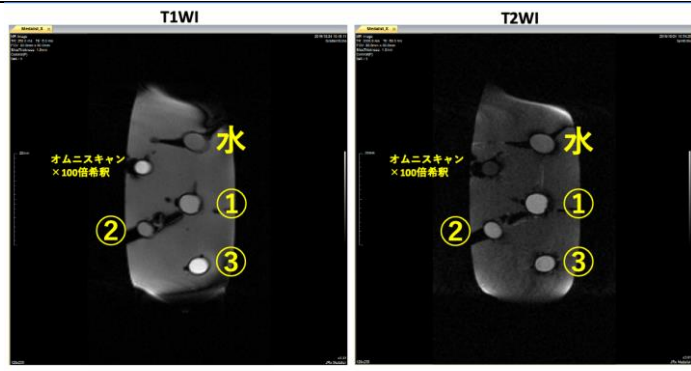
上記作成の、GdI3溶液、水(陰性コントロール)のNIR-II蛍光を評価するために、SHIMADZUのSAI-1000を用いて蛍光を評価した(図5)。結果はGdI3内包のCNTで十分なNIR-II蛍光を認めた。次に、MRIでの検討を行い、磁性イメージングについての可否を検討した。陽性コントロールとして造影剤のオムニスキャン、対比コントロールとして水を加えた。結果は、GdI3はT1、T2強調画像の両方で、水より濃く写り、陽性造影剤として利用できることが明らかとなった(図6)。



- ①GdI₃@DIPS1.0 (0.36 mg/mL) 分散後、遠心はしていない
- ②GdI₃@DIPS1.0 (0.50 mg/mL) 分散後、遠心分離して凝集したCNTを除去
- ③GdI₃水溶液 (0.336 mg/mL)

図5 NIR-II 蛍光測定

マウスの腫瘍モデルで造影効果を確認するために、局注して画像を取得した。両側の腫瘍部の右に局注した結果、2時間後でもNIR-II蛍光が検出できた(図7)。同様にMRIでも、左の水を注入した側にくらべて、白くのこり陽性造影剤として本材料が使用できることが確認できた(図8)。



- ① GdI₃@DIPS1.0 (0.36 mg/mL) 分散後、遠心はしていない
- ② GdI₃@DIPS1.0 (0.50 mg/mL) 分散後、遠心分離して凝集したCNTを除去
- ③ GdI₃水溶液 (0.336 mg/mL)

図6 GdI₃内包CNTの磁性イメージングの検討

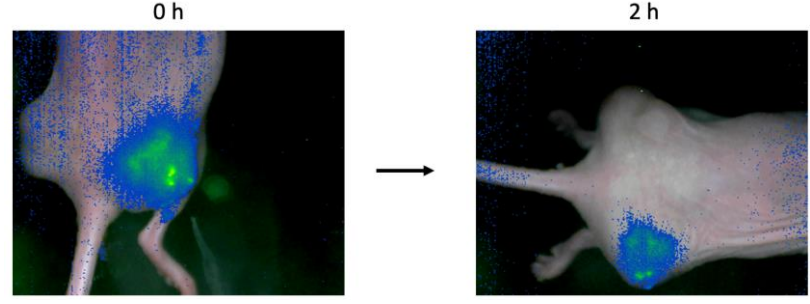


図7 動物 NIR-II イメージング画像

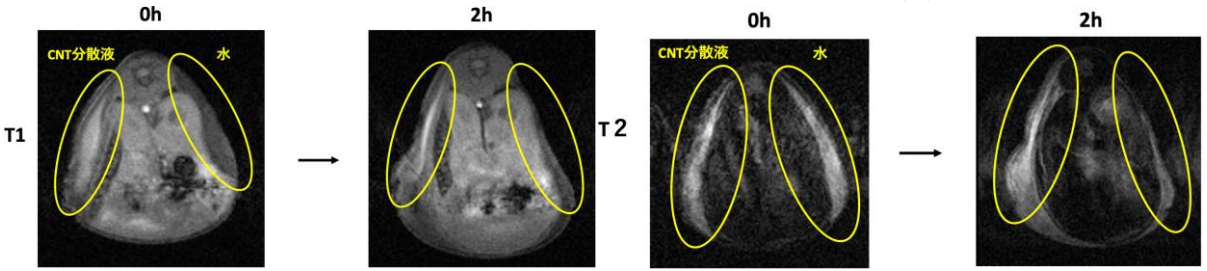


図8 動物 MRI 画像 : T1,T2 で陽性造影剤として白く写っている事がわかる

考察

新規金属内包 CNT を合成し、NIR-II の蛍光イメージングと MRI の磁性イメージングに同時利用できることを証明できた。また、明らかな生体毒性はなく、今後、生体イメージングに用いて、病態を明らかにするためにイメージングを行い実験していくことを計画している。