

|      |       |
|------|-------|
| 課題番号 | LR002 |
|------|-------|

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

|                |                     |
|----------------|---------------------|
| 研究課題名          | キラリティー磁気共鳴分子イメージング  |
| 研究機関・<br>部局・職名 | 北海道大学・大学院情報科学研究科・教授 |
| 氏名             | 平田 拓                |

1. 当該年度の研究目的

|  |
|--|
| <p>本年度は、プロジェクト全体の目的を実現するために必要な以下の課題の達成を目指した。</p> <p>(1) これまで開発した、電子常磁性共鳴イメージング装置と画像化ソフトウェアを改良し、より安定で高解像度なイメージングシステムを実現する。</p> <p>(2) 標的分子となるキラル分子の合成を進め、in vitroおよびin vivo実験が行えるようにする。さらに、キラル医薬品類似分子の合成を引き続き実施する。</p> <p>(3) また、画像化実験に先立ち、測定時間を確保するために、標的分子をマウスに投与する方法を探索する。平成24年度中に、キラル分子をマウスに投与し、電子常磁性共鳴分子イメージングで可視化する予備実験を行う。</p> |
|--|

2. 研究の実施状況

|  |
|--|
| <p>本課題のゴールである、キラル分子の生体内同時イメージングを実現するために、上記の三つのサブテーマについて研究・開発を行った。</p> <p>(1) 電子常磁性共鳴イメージング装置と画像化ソフトウェアの改良、安定で高解像度なイメージングシステムの実現</p> <p>本課題の目的であるキラル分子のイメージングが可能であることを実験的に示すために、東北大学・有本博一教授グループで合成したニトロキシルラジカルを用いて、in vitro系で同時電子常磁性共鳴イメージングを行った。実験には、hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl の鏡像異性体ペアを用いた。標的となるキラル分子の識別には、異なる電子常磁性共鳴スペクトルを示す窒素の同位体 <sup>14</sup>Nと<sup>15</sup>Nが用いられた。この実験により、初めて電子常磁性共鳴分光によるキラル分子の三次元同時イメージングの実験が可能であることが示された。この成果は、アメリカ化学会の分析化学専門誌、Analytical Chemistry に発表された(雑誌論文 2)。</p> <p>また、電子常磁性共鳴イメージング装置の改良を目指して、750MHzのマイクロ波共振器の解析と試作を行った。可視化範囲を均一な感度で測定するための設計指針と実験結果を得ることができたものの、測定</p> |
|--|

感度の向上には結びつかなかった。また、測定の安定性向のためマイクロ波共振器周りの固定法を改善し、位置合わせが安定に行えるようにした。また、同時イメージングのプログラムを改良し、グラフィカル・ユーザー・インターフェースを有するバージョンと、コマンドラインから起動する二つのバージョンを開発した。開発したプログラムについては、操作者の意見を入れ改善を試みた。動物実験の際に問題があれば、今後のプログラム開発において改善する。

## (2) 標的となるキラル分子の合成

生理活性を有するニコチン類似分子に TEMPO 系ニトロキシルラジカルを結合した化合物(キラル分子)を東北大学・有本教授グループにおいて合成した。鏡像異性体の関係にある R 体及び S 体の化合物の特性を明らかにするために、第一段階として通常の TEMPO 系ニトロキシルラジカル( $^{14}\text{N}$ )を R 体及び S 体のニコチン類似分子に結合した化合物を合成した。次の段階として、キラリティーの違いを電子常磁性共鳴分光により識別するために、S 体の化合物に  $^{15}\text{N}$  で標識された TEMPO 系ニトロキシルラジカルを、R 体の化合物に  $^{14}\text{N}$  で標識された TEMPO 系ニトロキシルラジカルを使用した。

合成された化合物について、北海道大学において次の三種類の手法により特性評価を行った。

### (a) アスコルビン酸による還元実験

合成した化合物が還元作用を受けた場合に、キラリティーの違いが還元反応に影響を与えないことを実験的に示した。イメージングのラベルとして用いられる TEMPO 系ニトロキシルラジカルの生体内における寿命は、S 体と R 体の化合物で差がないことが同時イメージングにおいて理想的である。そのため、750MHz 電子常磁性共鳴分光装置を用いて水溶液系でアスコルビン酸による還元反応の実験を行った。その結果、アスコルビン酸による還元作用は、S 体と R 体の化合物に等しく作用することが示された。

### (b) フーリエ変換赤外分光法による化合物の構造決定

別々に合成した化合物(R 体と S 体)が同じ振動構造になっていることを、赤外吸収スペクトルの一致により示した。また、量子化学計算(Gaussian09)により、合成した化合物の立体構造及び赤外吸収スペクトルを求めた。計算された赤外吸収スペクトルは実験的に得られたスペクトルと一致していることから、設計された分子構造が実現されていることが示された。

### (c) X バンド電子常磁性共鳴分光

化合物の電子スピン濃度を明らかにするために、化合物の電子常磁性共鳴スペクトルを測定し、電子スピン密度を S 体と R 体の化合物で比較した。電子スピン密度を比較することにより、正確に化合物の濃度をコントロールすることが可能となった。

また、化合物のラベルとして用いられるラジカルの生体内での寿命を長くするため、ラジカル部の構造が異なる化合物の合成を試みている。

## (3) 標的分子をマウスに投与する方法の探索

様式19 別紙1

合成された化合物のマウスへの投与実験を昨年度に引き続き実施した。この実験では、マウスの尾静脈から化合物を投与し、マウス頭部に達した化合物を 750MHz 電子常磁性共鳴イメージング装置により可視化した。この実験の主な目的は、合成した化合物が血液脳関門 (BBB) を通過し、脳に達することを示すことにある。マウスを用いた実験では、S 体の化合物と R 体の化合物を別々に投与し、それぞれの画像を取得した。札幌医科大学・藤井博匡教授グループにおいて、安定に撮像を行うために化合物の溶解方法を複数試みた。共に  $^{14}\text{N}$  で標識された S 体と R 体の化合物を用いて実験、並びに、 $^{14}\text{N}$  及び  $^{15}\text{N}$  で標識されたキラル化合物による投与実験を行った。

平成24年度の実験により、マウス頭部における化合物の可視化実験が実施可能な段階に到達した。今後は、キラル化合物の可視化が安定に行えるようにし、S 体及び R 体の化合物の体内動態の違いを明らかにすることを目指す。

3. 研究発表等

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <p>雑誌論文</p> <p>計 3 件</p>  | <p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Enomoto, H. Hirata, S. Matsumoto, K. Saito, S. Subramanian, M. C. Krishna, and N. Devasahayamu, Four-channel surface coil array for 300-MHz pulsed EPR imaging: Proof-of-concept experiments, <b>Magnetic Resonance in Medicine</b>, DOI: 10.1002/mrm.24702 (2013).</li> <li>Y. Miyake, X. Wang, M. Amasaka, K. Itto, S. Xu, H. Arimoto, H. Fujii, and H. Hirata, Simultaneous imaging of an enantiomer pair by electron paramagnetic resonance using isotopic nitrogen labeling, <b>Analytical Chemistry</b>, Vol. 85, No. 2, pp. 985-990 (2013).</li> <li>H. Fujii, H. Sato-Akaba, M. Emoto, K. Itoh, Y. Ishihara, and H. Hirata, Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by in vivo electron paramagnetic resonance imaging, <b>Magnetic Resonance Imaging</b>, Vol. 31, No. 1, pp. 130-138 (2013).</li> </ol> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>  |
| <p>会議発表</p> <p>計 15 件</p> | <p>専門家向け 計 15 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>J. Goodwin, S. Koda, M. Ohfuci, A. Pawlak, H. Yasui, V. Khramstov, H. Hirata, 4D spectral spatial pH mapping of mouse tumour using continuous wave-electron paramagnetic resonance imaging and pH sensitive imidazoline nitroxide, Proceedings of International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 20th Annual Meeting and Exhibition, 2012/5/7-11, Melbourne, Australia, p. 1708 (2012).</li> <li>S. Koda, J. Goodwin, V. V. Khramstov, H. Fujii, H. Hirata, EPR-based pH mapping using spectral-spatial imaging of sequentially scanned spectra, 2nd International Symposium on Electron Spin Science, O21, 2012/7/23-25, Matsushima, Japan (2012).</li> <li>S. Suzuki, H. Hirata, Marker-free co-registration technique in EPR/NMR imaging, 2nd International Symposium on Electron Spin Science, P21, 2012/7/23-25, Matsushima, Japan (2012).</li> <li>A. Enomoto, H. Hirata, Four-channel surface coil array for 750-MHz CW-EPR imaging, 2nd International Symposium on Electron Spin Science, P27, 2012/7/23-25, Matsushima, Japan</li> </ol> |

様式19 別紙1

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
|                                  | <p>(2012).</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. Y. Miyake, X. Wang, M. Amasaka, K. Itto, S. Xu, H. Arimoto, H. Fujii, and H. Hirata, Enantioselective molecular imaging of <sup>14</sup>N- and <sup>15</sup>N-labeled chiral nitroxyl radicals using electron paramagnetic resonance, 2nd International Symposium on Electron Spin Science, P34, 2012/7/23-25, Matsushima, Japan (2012).</li> <li>6. 平田拓, 電子スピン共鳴イメージング装置の最近の進展, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, 3S-07, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>7. 谷内勝哉, J. Goodwin, 永根大幹, 三宅祐輔, 安井博宣, 稲波修, A. Bobko, V.V. Khramtsov, 平田拓, EPRスペクトロスコピーによる腫瘍の細胞外pH測定, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, 3A-04, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>8. 江本美穂, 赤羽英夫, 平田拓, 藤井博匡, EPRイメージングによる六員環ニトロキシドのマウス頭部における酸化還元状態の評価, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, 3A-06, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>9. 榎本彩乃, 平田拓, CW-EPRイメージングのための4チャンネル・サーフェイスコイル・アレイの開発, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, 3B-14, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>10. 三宅祐輔, 王暁蕾, 天坂光男, 一刀かおり, 許述, 有本博一, 藤井博匡, 平田拓, キラルな<sup>14</sup>N, <sup>15</sup>N標識化ニトロキシルラジカルの同時かつ選択的なEPRイメージング, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, 3B-15, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>11. 高野祐真, 谷内勝哉, V. Khramtsov, 平田拓, pHマッピングの新手法の開発, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, P-56, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>12. 青野尚平, 永根大幹, 三宅祐輔, 奥村大地, 安井博宣, 稲波修, 平田拓, 生体内酸素分圧イメージングに向けた試薬の連続投与の実験, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, P-57, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>13. 鈴木詩織, 平田拓, マーカーを使用しないEPR/NMRコレジストレーション技術の開発, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, P-59, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>14. 竹内将人, 菅原弘雄, 平田拓, 750-MHzマルチコイル・パラレルギャップ共振器の高感度化実験, 第51回電子スピンサイエンス学会年会, P-60, 2012/11/1-3, 札幌コンベンションセンター (2012).</li> <li>15. 王暁蕾, 一刀かおり, 許述, 三宅祐輔, 江本美穂, 藤井博匡, 平田拓, 有本博一, 中枢系ニコチン受容体におけるin vivo EPRイメージングスピンプローブの合成, 日本化学会第93春季年会, 4E3-29, 2013/3/22-25 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (2013).</li> </ol> <p>一般向け 計0件</p> |
| <p>図書<br/>計0件</p>                | <p>なし</p>   |
| <p>産業財産権<br/>出願・取得状況<br/>計0件</p> | <p>(取得済み) 計0件<br/>(出願中) 計0件</p>   |

様式19 別紙1

|                   |  |
|-------------------|--|
| Webページ<br>(URL)   | <p>北海道大学大学院情報科学研究科 生体物理工学研究室ホームページ</p> <p><a href="http://www.bme.ist.hokudai.ac.jp/BPE/index-j.html">http://www.bme.ist.hokudai.ac.jp/BPE/index-j.html</a></p> <p>北海道大学「最先端・次世代研究開発支援プログラム」の研究者たち 見えないものを可視化する～キラル分子の追跡に挑戦 平田拓</p> <p><a href="http://or.research.hokudai.ac.jp/next/researcher/hirata/">http://or.research.hokudai.ac.jp/next/researcher/hirata/</a></p> |
| 国民との科学・技術対話の実施状況  | <p>平成24年10月27日(土)に、北海道大学サステナビリティウィークの公開講座「やさしい情報科学とライフィノベーション」(会場:北海道大学国際交流会館)において、「見えない物を見る!! キラル分子の追跡」と題して講師を務め、参加者(8名)に分子イメージングの研究を分かりやすく講演し、科学・技術対話を行った。</p>   |
| 新聞・一般雑誌等掲載<br>計0件 | なし   |
| その他               | なし   |

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

|      | ①交付決定額      | ②既受領額<br>(前年度迄の<br>累計) | ③当該年度受<br>領額 | ④(=①-②-<br>③)未受領額 | 既返還額(前<br>年度迄の累<br>計) |
|------|-------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| 直接経費 | 112,000,000 | 47,994,000             | 32,104,000   | 31,902,000        | 0                     |
| 間接経費 | 33,600,000  | 14,398,200             | 9,631,200    | 9,570,600         | 0                     |
| 合計   | 145,600,000 | 62,392,200             | 41,735,200   | 41,472,600        | 0                     |

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

|      | ①前年度未執<br>行額 | ②当該年度受<br>領額 | ③当該年度受<br>取利息等額<br>(未収利息を除<br>く) | ④(=①+②+<br>③)当該年度<br>合計収入 | ⑤当該年度執<br>行額 | ⑥(=④-⑤)<br>当該年度未執<br>行額 | 当該年度返還<br>額 |
|------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 直接経費 | 16,897,950   | 32,104,000   | 0                                | 49,001,950                | 48,823,608   | 178,342                 | 0           |
| 間接経費 | 45,421       | 9,631,200    | 0                                | 9,676,621                 | 7,898,927    | 1,777,694               | 0           |
| 合計   | 16,943,371   | 41,735,200   | 0                                | 58,678,571                | 56,722,535   | 1,956,036               | 0           |

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

|         | 金額         | 備考                      |
|---------|------------|-------------------------|
| 物品費     | 37,647,256 | 電子スピン共鳴装置、赤外分光光度計、実験試薬等 |
| 旅費      | 1,104,540  | 研究成果発表(オーストラリア、松島)等     |
| 謝金・人件費等 | 5,226,408  | 博士研究員人件費                |
| その他     | 4,845,404  | 装置リース代金、MRI機器使用料、英文添削料等 |
| 直接経費計   | 48,823,608 |                         |
| 間接経費計   | 7,898,927  |                         |
| 合計      | 56,722,535 |                         |

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

| 物品名                 | 仕様・型・性能<br>等                              | 数量 | 単価<br>(単位:円) | 金額<br>(単位:円) | 納入<br>年月日  | 設置研究機関<br>名 |
|---------------------|---|----|--------------|--------------|------------|-------------|
| 実験小動物用ハルス<br>オキシメータ | 米国スターライフサイ<br>エンス社製<br>MouseOxPLUS外       | 1  | 1,770,562    | 1,770,562    | 2012/10/31 | 札幌医科大学      |
| 2チャンネルレコーダ          | ハイオリサーチセンター<br>株式会社 ED210 e-<br>Corder210 | 1  | 882,630      | 882,630      | 2012/12/26 | 北海道大学       |
| 電子スピン共鳴装置           | 独逸フルカー・ハイ<br>オス社製                         | 1  | 20,979,000   | 20,979,000   | 2012/12/21 | 北海道大学       |
| 紫外可視分光光度<br>計       | 日本分光株式会社<br>V-650ST                       | 1  | 1,391,250    | 1,391,250    | 2013/1/30  | 北海道大学       |
| フーリエ変換赤外分<br>光光度計 外 | 日本分光株式会社<br>FT/IR-4200                    | 1  | 2,493,750    | 2,493,750    | 2013/1/30  | 北海道大学       |
| 純水製造装置              | メルクリポア<br>ZRXX003JP                       | 1  | 907,200      | 907,200      | 2013/2/21  | 北海道大学       |
| GPIBテスラガウスメ<br>ータ   | 米国F.W.BELL社<br>製 8010 外                   | 1  | 1,025,136    | 1,025,136    | 2013/3/4   | 北海道大学       |