

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用
(H14-ナノ-010)」に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大内 憲明 東北大学大学院医学系研究科

平成15 (2003) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

「ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用」に関する研究

----- 1
大内 憲明

II. 分担研究報告

1. 動物をモデルとした新規センチネルリンパ節蛍光検出生検法に関する研究

----- 6
武田元博

2. 第一原理計算に基づく金属内包シリコンフラーレンの分子設計

----- 9
川添良幸

3. フラーレンネットワーク合成-無機半導体ナノサイズセンシングカプセルの合成-
に関する研究

----- 13
粕谷厚生

4. 蛋白質結合型ナノ・カプセルの開発及び細胞マーキングへの応に関する研究

----- 18
佐竹正延

5. ラット蛍光計測用画像計測システムおよび蛍光同時多波長分光システムに関する研究

----- 20
小林正樹

6. 新規センチネルリンパ節蛍光検出生検法ならびCT・MRI利用拡大に関する研究

----- 22
石田孝宣

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙1、別紙2

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
（総括）研究報告書

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用

（主任）研究者 大内 憲明 東北大学大学院医学系研究科腫瘍外科学分野

研究要旨

新規センシングナノカプセルの創製による新たな診断治療薬の開発を目指して研究を行い、以下の点が明らかになった。

1. Cd/Se ナノクラスターを作製し、蛍光特性を解析し、蛍光強度および蛍光寿命が従来の蛍光色素に比べてはるかに優れていることを示した。
2. シリカコーティングビーズの作製し、同時に蛍光ビーズを用いて有用性、安全性評価のための動物実験を行い、センチネルリンパ節生検において最適なビーズの蛍光特性、サイズを決定した。
3. スーパーコンピューティングにより金属内包シリコンフラーレンの存在を初めて予測し、その実在が証明された。
4. 量子ドット結合抗腫瘍モノクローナル抗体を用いて培養癌細胞の染色に成功した。
5. より効率のよい蛍光計測を目指して高感度蛍光画像計測装置、および高分解能蛍光画像計測装置を試作した。

今後の展開として、医療分野においてはテーラーメイド診療、EBM に代表されるように、個々の病態に応じた治療法が求められつつあり、分子標的治療、センチネルリンパ節生検等新たな診断、治療法の開発が期待される。さらに生体分子標的検査試薬の応用範囲として、細胞をラベルしての解析に適していると考えられ、新規試薬の開発が期待される。今後、最適な条件を突き詰めて臨床応用を目指し、国民の健康に資する研究を行って行きたい。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名：武田元博（東北大学医学部附属病院、助手），川添良幸（東北大学金属材料研究所、教授），粕谷厚生（東北大学学際科学国際高等研究センター、教授），佐竹正延（東北大学加齢医学研究所、教授），小林正樹（東北工業大学、助教授），水関 博（東北大学金属材料研究所、助手），石田孝宣（東北大学医学部附属病院、助手），樋口秀男（平成15年度より、東北大学大学院工学研究科、助教授），小林芳男（平成15年度より、東北大学大学院工学研究科、助教授）

A 研究目的

1985年に発表されたフラーレンおよびナノチューブ構造はその強固かつ特異なかがご状、および円筒状構造から、多くの分野での応用が期待される。医学薬学分野では、有用性が期待されるがそのままでは有害な薬物を構造内に取り込むことで、無害化することが期待されている。しかし構造が強固なため内部に原子や分子を挿入することが困難であり、医療に応用された例はない。本研究はフラーレン・ネットワーク、コーティング剤を薬剤のカプセルとして用いることで、これまで生体に応用できなかった試薬を医療検査薬として活用し、かつアレルギー等の副作用が問題となっている検査薬品の副作

用を完全に取り除く技術の確立を目的とする。

B 研究方法

研究方法=上記目的のために、スーパーコンピューティングによるフラレンネットワーク等分子設計グループ（川添、水関ら）、フラレンネットワーク並びにコーティングビーズ作製グループ（粕谷ら）、応用法研究グループ（武田、佐竹、石田、樋口ら）をそれぞれ作り、それぞれが下記のテーマについて研究を行う。

1. 医療用蛍光試薬の開発：Gd/Seの蛍光ビーズを試験的に作製した。また市販の蛍光ビーズをシリカコーティングし、動物実験モデルによる有用性、並びに最適な計測条件の検討を行う。

2. X線造影剤の開発：ヨードを用いたセンシングナノカプセルを作製し、X線透過性、粒径の計測をおこない、実用化に向けた検討を行う。

3. 生体分子標的検査試薬の開発（佐竹ら）：ナノサイズセンシングカプセルを用いてin vivo, in vitroにおける新たな用途の検討により分子標的検査試薬を作製する。

4. 新規蛍光画像装置の試作：生体極微弱蛍光計測技術を応用した新規超高感度蛍光画像計測装置を試作した。この装置を用いて動物をモデルとしたセンチネルリンパ節生検モデルの検討を進めていく予定である。

5. スーパーコンピューターを用いたフラレンネットワークの分子設計：第一原理計算に基づく分子設計により、有用な分子構造の薬品を設計する。

6. 新規検査試薬の動物実験による有用性検証：上記で得られた試薬を実際に動物モデルに応用し、目的とする病変の検出を試み、有効性、安全性についての検証を行い、臨床への応用を目指す。

7. ナノサイズセンシングカプセルの新たな応用法開発：生体内の単分子検出技術の確立を目指す。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ、動物実験による有効性、安全性の検証が主目的である。動物を用いた実験はすべて全身麻酔下に行っており苦痛を伴うものではない。また本研究における動物実験計画は本学の動物実験委員会に実験計画書を提出し、認可されている。

C 研究結果

1. 医療用蛍光試薬の開発（粕谷）：Gd/Seの蛍光ビーズを試験的に作製した。また市販の蛍光ビーズをシリカコーティングし、実験に供した。なお、計画当初参加していなかったが、コーティング技術は極めて重要と考えられることから東北大学工学系研究科、小林芳男が参加することとなった。

2. X線造影剤の開発（粕谷ら）：まずヨード内包コーティングビーズの製造に着手した。今後はX線撮影装置による評価と最適なサイズ、について検討を行う

3. 生体分子標的検査試薬の開発（佐竹ら）：市販のquantum dotsと抗腫瘍モノクローナル抗体を結合させたマーカーを用いて培養細胞の表面抗原をマーキングし、蛍光顕微鏡による観察に成功した。

4. 新規蛍光画像装置の試作（小林、武田

ら) : 生体極微弱発光計測技術を応用した新規超高感度蛍光画像計測装置を試作した。この装置を用いて動物をモデルとしたセンチネルリンパ節生検モデルの検討を進めていく予定である。

5. スーパーコンピューターを用いたフラーレンネットワークの分子設計 (川添、水関ら) : スーパーコンピューターを用い、従来存在し得ないと考えられた遷移金属内包切頭二十面体シリコンフラーレンの存在を初めて予測することに成功し、初めてその実在が中島らによって実証された。第一原理に基づく分子設計の有用性が改めて実証された。今回の研究でシリコンフラーレンもセンシングナノカプセルのケージとして有力な候補となることがはっきりした。

6. 新規検査試薬の動物実験による有用性検証 (武田、石田ら) : ラットをモデルとして体表からのセンチネルリンパ節検出を目的とした蛍光計測実験を行った。この計測で、生体計測において最適なビーズの蛍光波長とサイズを決定した。さらにこの内容に基づいて特許申請を行った。今後、更なるあらたな診断応用の道を探る予定である。

7. ナノサイズセンシングカプセルの新たな応用法開発 : 当初計画には盛り込まれていなかったが、この目的のため単分子計測を行ってきていて効率よい蛍光計測に詳しい東北大学工学系研究科、樋口が参加することとなった。樋口は今後、単分子計測について応用、計測法の検討を行う予定である。

D 考察

1. 療用蛍光試薬の開発 (粕谷) : Gd/Seの蛍光ビーズについて、光特性の検証を行うとともに、コーティング材料、厚さなど最適なコーティング技術を今後目指す必要があり、随時動物実験を行い、得られたビーズの有効性、安全性を検証して行きたい。また市販蛍光ビーズのシリカコーティングについてもコーティング材料、厚さなど最適なコーティング技術を確立する必要がある。なお、ここまで述べたように、ナノカプセルのコーティング技術は極めて重要であり、東北大学工学系研究科、小林芳男の参加は今後研究を進める上で大きな力となる。

2. X線造影剤の開発 (粕谷ら) : ヨード内包コーティングビーズについては、今後最適なヨード化合物を探索しつつ、X線撮影装置による評価と最適なサイズ、について検討を行必要がある。

3. 生体分子標的検査試薬の開発 (佐竹ら) : 市販のquantum dots (QDs)と抗腫瘍モノクローナル抗体を結合させたマーカーを用いての実験は今後、担癌マウスのin vivoイメージングを検証するとともに、QDsの無害化を進め、早期の臨床応用を目指したい。

また、使用可能なモノクローナル抗体の種類を増やして行きたい。

4. 新規蛍光画像装置の試作 (小林、武田ら) : 生体極微弱発光計測技術を応用した新規超高感度蛍光画像計測装置を試作した。これらの高感度な装置を用いてより深部方向の対象を計測する技術の開発を進めていく予定である。

5. スーパーコンピューターを用いたフラーレンネットワークの分子設計 (川添、

水関ら) : スーパーコンピューターを用い、さらに多くの従来存在し得ないと考えられるフラレンネットワークを用いた物質を設計し、実証していきたい。金属内包シリコンフラレについてはセンシングナノカプセルとして有力な候補となったことから大量合成の道を探っていくきたい。

6. 新規検査試薬の動物実験による有用性検証 (武田、石田ら) : ラットをモデルとして体表からのセンチネルリンパ節検出を目的とした計測系をさらに効率のよいものに改良を進め、更なるあらたな診断応用の道を探る予定である。

7. ナノサイズセンシングカプセルの新たな応用法開発 : さらに単分子イメージングへの応用も行うべく樋口秀男・東北大学工学研究科金属工学専攻・助教授が加わることとなった。樋口らは今後、単分子計測について新規の応用、計測法の検討を行う予定である。

E 結論

ナノサイズセンシングカプセルは新たな医療診断技術に応用されることがはっきりしてきた。これまでどころ、研究はほぼ予定通りに進行しており、新しい診断技術の開発が期待される。

F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G 研究発表

1. 論文発表

1) Kimura N, Yoshida R, Shiraishi S, Pilichowska M, Ohuchi N. Chromogranin A and chromogranin B in noninvasive breast carcinoma. *Endocrine Pathology* 13 (2), 117-122, 2002.

2) Yoshida R, Ohuchi N, Kimura N. Clinicopathological study of chromogranin A, B and BRCA1 expression in node-negative breast carcinoma. *Oncology Reports*, 9: 1363-1367, 2002

3) Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Kimura M, Ohuchi N, Sasano H. In situ production of estrogens in human breast carcinoma. *Breast Cancer*, 9 (4): 296-302, 2002

4) Klabunde CN, Sancho-Garnier H, Taplin S, Thoresen S, Ohuchi N, Ballard-Barbash R. Quality assurance in follow-up and initial treatment for screening mammography programs in 22 countries. *Int J Qual Health Care* 2002. 14: 449-461.

5) Ishida T, Moriya T, Ohnuki K, Takeda M, Ohuchi N. Pathological assessment of intraductal spread of carcinoma in relation to surgical margin state in breast conserving surgery. *Jpn J Clin Oncol* (in press)

6) Sakayori M, Kawahara M, Shiraishi K, Nomizu T, Shimada A, Kudo T, Abe R, Ohuchi N, Takenoshita S, Kanamaru R, Ishioka C. Evaluation of the diagnostic accuracy of the stop codon (SC) assay for identifying protein-truncating mutation in the BRCA1 and BRCA2 genes in familial breast cancer. *J Hum Genet*,

2003 (in press)

7) 大内憲明、武田元博、川添良幸、佐竹正延*、粕谷厚生。クラスター利用ナノ医療。ナノ学会会報 Vol.1 No. 2, 2003 (印刷中)

2. 学会発表

1) 大内憲明、武田元博。東北大学における医学連携プログラム。文部科学省主催第2回産学連携フォーラム-医学2002、科学未来館、東京、2002年12月18日。

2) 大内憲明、武田元博、川添良幸、粕谷厚生、山家智之。ナノテクノロジーの医学・医療応用への期待。第2回メディカルインフォマテクスシンポジウム、東大駒場先端科学技術研究センター、東京、2003年3月27日。

3) 佐藤正明、石井慶造、大内憲明。東北大学における医学連携。日本学術会議・医用生体工学専門委員会MEフォーラム2003「未来医療を拓く医工連携」、東京大学本郷キャンパス、東京、2003年1月20日。

4) Ohuchi N, Takeda M, Kawazoe Y, Kasuya A, Kamei T, Satake M. Biophoton cancer imaging and generation of nano-size

sensing capsule. Biophoton cancer imaging and generation of nano-size sensing capsule., Sendai, January 28, 2003.

5) Ohuchi N, Kawazoe Y, Kasuya A, Takeda M, Nakajima M, Tada H, Kamei T, Satake M. Nano-size sensing capsule for future medical application. Nanomedicine Workshop, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, March 19-20, 2003.

II. 知的財産権の出願登録状況

1. 出願日：平成14年12月26日

出願番号：特願2002-378407

発明の名称：多重粒子及びその製造方法

共同出願人：大内憲明、川添良幸、粕谷

厚生、佐竹正延、東レ・ダウコーニング

株

2. 出願日：平成15年03月10日

出願番号：特願2003-063753

発明の名称：センチネルリンパ節検出剤及びその検出方法

共同出願人：大内憲明、武田元博、川添

良幸、粕谷厚生、佐竹正延、東レ・ダウ

コーニング株

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用
動物をモデルとした新規センチネルリンパ節蛍光検出生検法に関する研究
（分担）研究者 武田 元博 東北大学医学部附属病院

研究要旨
新規センシングナノカプセルの創製による新たな診断治療薬の開発を目指して、センチネルリンパ節生検におけるナノサイズセンシングカプセルの最適な蛍光波長、サイズの決定、およびコーティングビーズ作製とその有用性、安全性評価のための動物実験を行った。

A 研究目的

本研究はフラーレン・ネットワーク、コーティング剤を薬剤のカプセルとして用いることで、これまで生体に適用できなかった試薬を医療検査薬として活用し、かつアレルギー等の副作用が問題となっている検査薬品の副作用を完全に排除する技術の確立を目的とする。筆者らはセンシングナノカプセルをセンチネルリンパ節生検に応用するべく、蛍光計測において最適な波長、サイズを決定することを本年度の主目的に据えて研究を行った。

B 研究方法

研究方法=センシングナノカプセルをセンチネルリンパ節生検に応用するべく、下記のテーマについて検討を行った。

1. 新規蛍光ビーズを用いた有用性・安全性試験：粕谷、および中途から参加することとなった小林芳男らが作製したシリカコーティング蛍光ビーズを用いて、動物実験モデルによる最適な蛍光特性、サイズ等計測条件の検討を行い臨床への応

用を目指す。その際体内分布等安全性についても検討をこなう。

2. X線造影剤の開発：粕谷、小林芳男らが作製したヨード内包センシングナノカプセルを用い、X線透過性、粒径の計測をおこない、実用化に向けた検討を行う。
3. 新規蛍光画像装置の試作：分担研究した小林正樹と共同で蛍光計測に必要な試作機的设计を行い、性能を評価する。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ、動物実験による有効性、安全性の検証が主目的である。動物を用いた実験はすべて全身麻酔下に行っており苦痛を伴うものではない。また本研究における動物実験計画は既に本学の動物実験委員会に実験計画書を提出し、認可されている。

C 研究結果

1. 新規蛍光ビーズを用いた有用性・安全性試験：最初に市販の蛍光ビーズを用いてセンチネルリンパ節計測に最適な蛍光

波長、サイズの検討を行った。その結果、yellow-greenの蛍光は生体、特に皮膚等の自家蛍光、粕谷、小林芳男らと重なり、観察に適しないことがわかった。一方dark redの蛍光は自家蛍光に邪魔されず、体外から計測可能であることが明らかになった。また、センシングナノカプセルの粒径も100nm以上はリンパ系で輸送されないことがわかり、最適なサイズの決定も行うことができた。この結果を基に蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検に関しての特許を出願した。さらにこの内容は平成15年度第62回日本癌学会で報告予定である。

粕谷、小林芳男らが作成したシリカコーティング蛍光ビーズを実験に供した。現在有効性と安全性について検討を進めている。

2. X線造影剤の開発：粕谷、小林芳男らと共にヨード内包コーティングビーズの製造に着手した。今後はX線撮影装置による評価と最適なサイズ、について検討を行う。

3. 新規蛍光画像装置の試作（小林、武田ら）：生体極微弱発光計測技術を応用した新規超高感度蛍光画像計測装置を試作した。この装置を用いて動物をモデルとしたセンチネルリンパ節生検モデルの検討を進めていく予定である。

D 考察

1. 新規蛍光ビーズを用いた有用性・安全性試験：今後、さらに最適なビーズの蛍光特性を探ると共に、粕谷らが作製したより蛍光効率の高いGd/Seの蛍光ビーズについても動物実験を行い、有用性・安

全性の検討を行う必要がある。またコーティング材料、厚さなど最適なコーティング技術を今後も目指す必要があり、随時動物実験を行い、得られたビーズの有効性、安全性を検証して行きたい。

2. X線造影剤の開発：粒径、X線透過特性の計測終了後、動物実験による有効性、安全性の検討を行う予定である。

3. 新規蛍光画像装置の試作（小林、武田ら）：生体極微弱発光計測技術を応用した新規超高感度蛍光画像計測装置を試作した。これらの高感度な装置を用いてより深部方向の対象を計測する技術の開発を進めていく予定である。

E 結論

以上の実験によりナノサイズセンシングカプセルは新たな医療診断技術として利用可能であることがわかってきた。今後も研究を進め、さらに新しい応用や新しい診断技術の開発が期待される。

F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G 研究発表

1. 論文発表

武田元博、石田孝宣、大貫幸二、大内憲明：乳癌治療の最前線—乳癌の新しい治療戦略、外科治療、87巻6号、48-55、2002

2. 学会発表

1) 武田元博、小林正樹、高山昌理子、小泉亮、大貫幸二、石田孝宣、大内憲明、乳腺腫瘍の生物フォトイメージングに

よる病理診断への応用試み、第10回日本乳癌学会総会、平成14年7月5日2) 武田元博、高山昌理子、小林正樹、中島護雄、楊明、大貫幸二、石田孝宣、大内憲明、乳腺腫瘍の生物フォトン画像計測 I 一腫瘍の生物フォトン画像と組織像の相関一、第61回日本癌学会総会、平成14年10月2日

3) 高山昌理子、小林正樹、武田元博、中島護雄、楊明、大貫幸二、石田孝宣、大内憲明、消化器癌切除標本の生物フォトン画像計測 I、第61回日本癌学会総会、平成14年10月2日

4) Takeda M, Ohuchi N, Nakajima M, Tada H, Kobayashi M, Innovative Cancer Imaging by Biophoton Emission, 21st Century COE Program University of

Hawaii Nanomedicine Workshop, Mar., 19, 2003

II. 知的財産権の出願登録状況

出願日：平成15年03月10日

出願番号：特願2003-063753

発明の名称：センチネルリンパ節検出剤及びその検出方法

共同出願人：武田元博、大内憲明、川添良幸、粕谷厚生、佐竹正延、東レ・ダウコーニング株

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
（分担）研究報告書

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用
第一原理計算に基づく金属内包シリコンフラレンの分子設計
（分担）研究者 川添 良幸 東北大学金属材料研究所

研究要旨

スーパーコンピューターを活用した第一原理シミュレーション計算によって、金属原子を内包したシリコンクラスターが対称性の良い様々な形状を採りながら極めて安定なナノ構造体を形成することを、実験に依らずに初めて予言した。³⁾ この金属内包シリコンクラスターの形状と物性は内包金属原子によって変わる。このクラスターは、実験的に、昨年、分子科学研究所の茅所長のグループが作成に成功し、今後の大量合成が期待されている。

A 研究目的

本研究はフラレン・ネットワーク、コーティング剤を薬剤のカプセルとして用いることで、これまでにない高効率な医療検査試薬を創製することを目的とする。炭素の新ナノスケール構造体であるフラレンとナノチューブは、1985年の発見以来、精力的に研究されて来たが、シリコンのナノ構造体に関しては、まだ十分な探索がなされていない。その主な理由は、20量体程度のシリコンクラスターは9ないし10量体を組み合わせた極めて歪んだ形をしており、あまり安定ではないことが知られているからである。我々はスーパーコンピューターを活用した第一原理シミュレーション計算によって、シリコンクラスターが対称性の良い様々な形状を採りながら極めて安定なナノ構造体を形成し得るか否か検討した。

B 研究方法

1 第一原理計算とは何か？

80年台の終わり頃から、第一原理計算（first principles calculation、*ab initio* method）という用語が、物理、化学、薬学、材料、さらには生体研究等の幅広い分野に多数登場するようになった。物質は、半導体であろうがタンパク質であろうが、全て同じ体系、即ち、量子力学の法則に従いクーロン相互作用する多数の電子と原子核からなる多体系である。すなわち、既に世の中に存在する、またはこれから創製したい物質は、量子力学の方程式を解くことによって、その構造を完全に決定でき、その物理・化学的性質から生起する反応まで完全に予測可能である。全く実験値を使わないため、実験に頼らず、電子・原子レベルでのシミュレーション計算により、試験管の代わりに、「計算機の中で」要求仕様に合致した物質を合成することができる。これが、

理想的な第一原理計算による新物質設計である。¹⁾

2 計算機パワーの限界

上述のように、第一原理計算は、原子の質量や電子の電荷の値等の基本物理量以外は、「実験から得られるパラメータは一切使わない」。これは事実である。しかし、近似は沢山している。その意味で、「一意的な解を出せる訳ではない」のである。現在の標準理論である局所密度近似 (Local Density Approximation, LDA) は、60年代に米国のコーン教授によって開発された。しかし、80年代前半までは計算機パワーが十分ではなく、実験で決められた構造を使い、単位胞内に数原子を含むだけのバルク結晶への適用、すなわちいわゆるバンド計算に止まっていた。ところが、80年代になってクレイ社のベクトル型スーパーコンピュータと、大幅なメモリー節約を可能としたカー・パリネロ法の出現により状況は一変した。種々の新有用物質設計が可能となり、第一原理計算が実験、理論に次ぐ第三の研究手法として認識され始めたのである。

薬学研究では、コンビナトリアルケミストリーが多用され、さらにシミュレーション計算によるフィルタリングもなされて、効率的な新薬開発が行われるようになってきている。しかし、一般的な新物質・新材料・新素材（これらの区別は日本語のみ。英語では全て materials となるのは、我が国が材料立国であることの証！）開発においては、未だに経験と勘に頼る設計開発技法が一般的である。その主たる理由は、既に膨大な探索がなされ、3

元系、4元系どころか、ジェットエンジン材料等では10元系までが実用化されており、商品化されている物質に近い範囲での更なる改善に重点がおかれているからである。一旦、膨大なコストがかかっても、本質的な新物質を創製する気概がなければ、シミュレーション研究を基盤とした飛躍的な新物質開発はなし得ない。

3 第一原理計算法の発展

LDAでは、縮退していない基底状態を正しく記述できる。しかし、鉄の基底状態が実験とは異なるfcc構造になり、バンド幅も実験値を再現しない。また、半導体のバンドギャップは、半分程度の値になる。通常のLDAでは電子数の3乗で計算量が増え、取り扱える系はせいぜい数百原子に限られるため、計算量を電子数の1乗にするオーダーN法が考えられている。ただし、この方法は基本的に遠距離力を打ち切るのので、問題が生じる。すなわち、共有結合系には適用できても、金属の研究には難しい。また、擬ポテンシャル法では、系のエネルギーの絶対値算定ができない。カー・パリネロ法は、断熱近似を適用しているため、正しく化学反応過程を記述できない、つまり本当の分子動力学法ではない。

このように、現状の標準理論であるLDAには、多くの問題点がある。その解決には、「より高度な近似」を適用すれば良い。例えば、鉄の結晶の基底状態がbcc構造であることを再現するためには、一般化勾配近似GGA (General Gradient Approximation) が必要である。エネルギ

一の絶対値算定には、全電子全ポテンシャル法を適用すれば良い。半導体のバンドギャップはGW (Green 関数—パーテックス) 近似で完全に算定できる。イオン化ポテンシャルや電子親和力もGW近似によって正しく求められる。ただし、GW近似では、電子数の6乗に比例して計算量が増える。化学反応過程を追跡するためには、断熱近似をやめ、シュレディンガー方程式を時間依存で解けば良い。我々は、これらの「通常の第一原理計算を超えたシミュレーション技法」を開発し、スーパーコンピューターを活用してベクトル化及び並列化を最大限に行い、種々の物質に対する適用を行っている。²⁾

4 シリコンフラレン

炭素の新ナノスケール構造体であるフラレンとナノチューブは、1985年の発見以来、精力的に研究されて来たが、シリコンのナノ構造体に関しては、まだ十分な探索がなされていない。その主な理由は、20量体程度のシリコンクラスターは9ないし10量体を組み合わせた極めて歪んだ形をしており、あまり安定ではないことが知られているからである。我々は、スーパーコンピューターを活用した第一原理シミュレーション計算によって、金属原子を内包したシリコンクラスターが対称性の良い様々な形状を採りながら極めて安定なナノ構造体を形成し得るか否かを検討した。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ動物、人体を対象とした実験を行っていないため倫理的問題は生じな

い。

C 研究結果

金属原子を内包したシリコンクラスターが対称性の良い様々な形状を採りながら極めて安定なナノ構造体を形成することを、実験に依らずに初めて予言した。³⁾ この金属内包シリコンクラスターの形状と物性は内包金属原子によって変わる。このクラスターは、実験的に、昨年、分子科学研究所の茅所長のグループが作成に成功し、今後の大量合成が期待されている。

D 考察

シリコンは極めて高精度で精製され、安価なため、工業上、今後とも極めて重要な元素であり、この新構造体の発見は、近い将来のシリコン基ナノデバイス設計に大きな寄与をなすものと期待される。この金属内包シリコンクラスターのようなナノスケールの物質には可視光発光物質があり、それらを適用して、安全なセンチネルリンパ節生検による最小手術実現への応用を目指すのが本プロジェクトである。

単独のクラスターだけでも、各種の新規な物性が期待出来るが、さらにこれらを組み合わせた構造体を考える。クラスターを結合して2量体が構成できる。例えば、(a)Zrとか(b)Tiを内包したシリコン16量体2個を結合した擬似分子が可能である。(a)の場合は、フラレン構造を保持しながら結合しており、次々と同様の操作を行えば金属内包シリコンナノチューブを構築できる。一方、(b)では、結合はファンデルワールス的で弱く、クラ

スターは安定に存在するため、クラスターの独自性を保ったまま、自己組織化を行わせることが出来る。同様に、磁性を持つ金属内包シリコンクラスターを自己組織化させれば、ナノ磁気記録媒体の創製が可能となる。これらの中には半金属も見つかっており、スピントロニクス用材料として有望である。このように、クラスターを大量に作成し、それらを組み合わせる有用な物性を有する構造体を作る、というアイデアは、真にナノテクノロジーの手法である。

E 結論

シリコンフラーレンを初めとして、多くの可能性のある発光素子用ナノスケールクラスターを「計算機の中で」仮想実験として生成し、その物性の詳細を検討している。その中で、CdSe は一つの有望なクラスターである。また、サイズを調整するため、シリカで修飾した状態に関する第一原理計算を実行し、その影響を検討している。将来、これらの有用物質が大量に合成されるようになれば、さら

に計算機シミュレーションとの共同研究によって、加速度的に機能性の高い新物質を創製することが可能となる。

F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G 研究発表

3. 論文発表

1. Kawazoe Y, Esfarjani K, and Ohno K, *Materials Design by Computer Simulation*, Springer-Verlag, 1999.

2. Ishii S, Ohno K, Kawazoe Y, Louie S, *Phys. Rev. B* 63 (2001) 1551041.

3. Kumar V, Kawazoe Y, *Phys. Rev. Lett.*, 87 (2001) 045503-1.

II. 知的財産権の出願登録状況

研究代表者と同じ

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
（分担）研究報告書

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用

フラーレンネットワーク合成-無機半導体ナノサイズセンシングカプセルの合成-

（分担）研究者 粕谷 厚生 東北大学学際科学国際高等研究センター

研究要旨

本研究では炭素フラーレンの如くナノメートルサイズでネットワーク構造をとる物質の内部或いは外部に原子、分子、蛋白質、薬剤を結合させたナノセンシングカプセルを作製し、医療への応用を図る。初年度はネットワーク物質として II-VI 族半導体微粒子或いは磁性粒子について、作製とコーティングによるカプセル化の方法を開拓して試料の評価を行った。

A. 研究目的

本研究ではナノメートルの微小空間に置かれた物質或いは組織の位置検出、動作認識、異常探知などを、非破壊、実時間、遠隔、その場観察でセンシングするナノサイズの高機能微粒子としてフラーレンを始め、ネットワーク構造を持つ無機半導体の作製とナノ医療への応用技術を開拓する。生体内の多様な機能は、基本的には生体分子・組織の構造、幾何学形状、位置、向き、及び時間的变化によってもたらされる。従って分子・組織に標識を付着させて静的、動的な状態を詳細に捉えることが出来れば、機能の仕組み或いは異常を非破壊且つ遠隔的に認識するセンサーの役割を果たす。この標識として無機半導体を採用する。これにより例えば蛍光体を標識とする場合は、従来より用いられてきた有機色素の寿命、不安定、低発光効率等の欠点を除去することが出来る。

又磁性体の場合は微粒子化することに

よって磁性機能の制御が行える。

一方、無機半導体材料は有機や生体分子との結合が容易でない難点がある。又体内で有害な種類も多い。シリカや炭素材料によるカプセル化を施して所定の分子、官能基、受容体等との結合を可能にすると共に無害化を果たすことにより新たなナノ医療への応用を試みる。

B. 研究方法

初年度はナノサイズセンシングとして蛍光体標識を取り上げ、その作成とシリカによるカプセル化についての実験を開始した。物質をナノメートル程度に小さくした半導体微粒子は、顕著な量子閉じ込め効果によって光吸収係数の増大、発光スペクトルの先鋭化、効率の増強などが起きる。

これらの効果によって発光の波長、強度、寿命、効率、偏光度、旋光度等が、粒子の大きさや表面修飾によって多様に制御出来る。この有用な材料学的諸特性

を備えたナノサイズセンシングの設計と製作を行い、ナノ医療センサーとしての性能評価を進めた。

試料として可視波長領域で効率よく発光する特性を有することで光通信やオプトエレクトロニクスへの応用が試みられている物質である II-VI 族化合物半導体、CdS、CdSe、ZnS、ZnSe 等を取りあげた。無機物で化学的に安定であるために光照射による特性の劣化が小さい特徴を有する。従来より効率の良い蛍光体として有機色素が知られているが、ナノサイズに微小化すると化学的に不安定となって効率の劣化が激しくなる。その理由の一つの色素分子の中で実際に発光に関わる領域は極一部に限られており、光照射によってその部分だけが局所的に繰り返し励起を受けて構造変化を起こす。一方、上記半導体は 2 種類の元素で構成される一様な物質であるために、光照射によって全体が一様に励起されて発光する。従って微粒子になっても原理的に劣化が起きにくい特徴がある。

半導体のもう一つの利点は、量子効果によってサイズを小さくするとエネルギーギャップが広がって発光の波長も短波長にずれる。このことから、物質を変えなくてもサイズを変化させるだけで特定の波長で発光する粒子を作ることが出来る。

一方有機色素では発光する部位が局所的に限られており、サイズを変えても発光波長は殆ど変化しない。波長を変えるには分子或いは部位を別なものに置き換えるしかない。

ここで注目しているナノサイズ・セン

シングカプセルについてまずは、無害化が実際的な最重要課題である。このため既にポリスチレン微粒子に有機色素を埋め込んだ発光標識をつかってシリカによるコーティング技術の開発を行った。

C. 研究結果

計画の実施にあたっては流動研究員 2 名と協力して「ナノサイズ・フォトニック半導体の作製と発光特性の解析」と「化合物半導体のカプセルリングとセンシング化」を課題の中心に据えた。

1. 試料作製、機能性の高いナノサイズ・フォトニック半導体の探索

真空中に孤立するナノサイズ・フォトニック半導体粒子については過去の実験から、磁性、伝導、光学現象において極めて興味深い物性が見出されている。これらの実験結果を解析し、材料として機能性が顕著なナノサイズ・フォトニック半導体の探索を新たに行った。

2. ナノサイズ・フォトニック半導体粒子の大量合成と安定化

これらの高機能性ナノサイズ・フォトニック半導体粒子の大量合成を、各種化学的手法によって行った。安定化についてはフォトニック半導体粒子表面構造に着目し、化学的に安定な種類を選択、或いは表面の酸化や修飾による不活性化を図ることで達成した。

3. サイズの単一化と集合化

安定化を行ったフォトニック半導体粒子は溶液中に分散することが出来、遠心分離、電気泳動、液体クロマトグラフィー等の分離法による単一化する方法を開発した。ナノ粒子の集合化は真空中に於

ける蒸着、溶液からの固化、電気泳動による液中の堆積を行った。

4. ナノサイズセンシング半導体のシリカコーティングによるカプセル化

ナノサイズ・センシング半導体微粒子の無害化コーティングの予備実験として有機色素を埋め込んだ、ポリスチレン蛍光標識である蛍光/PS_t コロイド粒子 (FluoSpheres® (F-8803), Molecular Probes, Inc.) のシリカによるコーティング技術の開発を行った。コーティング原料として Tetraethylorthosilicate (TEOS, 和光純薬工業株式会社) を用いた。又、安定剤として Polyvinylpyrrolidone K-30 (PVP, ナカライテクス株式会社) を添加した。

蛍光/PS_t に PVP を作用させてシリカでコーティング出来ることがわかった。ただし、シリカコーティングしてはいるが、シリカ単独粒子も多数見られた。また、PVP を添加後、洗浄するしないに関わらず、シリカコーティング出来たことから、一度蛍光/PS_t の表面に作用すればシリカコーティング出来ると考えられる。また、PVP を添加したまま TEOS、NH₃ を反応させた場合と、PVP を添加し一晩反応させ洗浄後 TEOS、NH₃ を反応させた場合では、[TEOS]=0.02M のときは、あまり違いが無いように観察されたが、TEOS 濃度を増加させた場合は [TEOS]=0.4M のとき、PVP を添加したまま TEOS、NH₃ を反応させた場合のほうがシリカ単独粒子の成長を抑制していると考えられる。

以上より [TEOS]=0.02M, [H₂O]=10.9M, [NH₃]=0.4M, PVP=10g/L のとき蛍光/PS_t にシリカコーティングが確認でき、また、

PVP を添加したまま TEOS、NH₃ を添加した方が観察しやすいと推測され、それぞれの濃度を変化させた際シリカコーティングの状態を調べて最適条件を求めた。

D. 考察

1. ナノサイズ・フォトニック半導体の作製と発光特性の解析

先ず試料については機能性の高いナノサイズ・フォトニック半導体の探索、大量合成と安定化、及びサイズの単一化と集合化等の基本的技術を習得することが出来た。

今後フラーレンのような籠状のネットワーク構造を取るフォトニック粒子を作成して行くための方策を検討した。その結果 II-VI 族半導体において新しい籠状構造を持つナノ粒子を見出し、形状及び光学的特性を解析して考察を加えた。II-VI 族半導体で、ネットワーク的構造を始めて創製することが出来たことはナノ医療センサーへの応用に関して意義深い。質量分析、電子顕微鏡、電子エネルギー損失分光、各種光学測定により、II-VI 族化合物は基本的に SP₃ 結合による 4 員環及び 6 員環のネットワークで構成される多面体構造であることがわかった。マジック数として CdSe では (CdSe)₃₃ 及び (CdSe)₃₄ が特に安定で、その他 13 及び 19 が比較的安定であることもわかった。

炭素系フラーレン、ナノチューブネットワークは基本的にはグラファイトのように SP₂ 混成軌道によって面状に結合した骨格を持っている。化合物においては III-V 族の一つである BN も同様の結合が可能でナノチューブが実際に合成され

ている。一方 III-V 族化合物は SP³ 混成軌道も可能で、バルクでは Wurtzite 或いは Zincblende 構造をとる。この SP³ 混成軌道で出来るナノ粒子がどのような構造を安定に取り得るかについては幾つかの報告がある。一つはバルクとほぼ同じ 4 配位構造をとり、周囲をリガンド分子で囲まれて安定化しているナノ粒子が II-VI 族化合物である CdS で合成されている。

この SP³ 結合においてはネットワーク構造も可能と考えられる。BN において 4 員環と 6 員環からなるネットワークで出来た籠状の多面体が見付かったとする電子顕微鏡観察の報告があるがあるが、その後の追試例は極めて少ない。最小の大きさの多面体は 4 員環が 6 個、6 員環が 8 個の 14 面体で、(BN)₁₂ に相当する。次に大きい多面体は 4 員環の数は 6 個で変わらずに 6 員環が 12 個に増えた 18 面体で、(BN)₁₆ になる。次が 4 員環 6 個、6 員環 24 個の 30 面体で、(BN)₂₈ となる。同じ SP³ 混成軌道で結合している II-VI 族化合物についても同様の籠状多面体が可能と予測される。いずれもバルクと同じ化学量論的な組成であるところに特徴があり、表面の不對電子を最低にしている。

2. 化合物半導体のカプセル化とセンシング化

ナノサイズセンシング半導体微粒子の無害化コーティングについて、PVP を加えるとシリカコーティングができることに注目し、この PVP がこのシリカコーティングがどのように関わっているかを考察した。

まず、考えられるのは、PVP に特徴的な

ピロリドン部分が反応に関係している場合が考えられる。しかし、多くの場合 PVP は安定剤として様々なところで用いられている。そこで、PVP が安定剤の例として用いられるときに、よく一緒に文献に載っている PVA (ポリビニルアルコール) を用いて実験を試みた。なお、実験手順は PVP のときとほとんど変わらないが、PVA は PVP よりも水に溶けにくいいため、蛍光/PS_t コロイド粒子を添加する前に PVA を予め水に溶かしてから (湯せん使用)、蛍光/PS_t コロイド粒子を添加した。

結果ら PVA を用いた場合でも蛍光/PS_t にシリカコーティングすることが可能だといえる。PVA でもシリカコーティングが可能であることから、PVP のピロリドン部分が反応に直接関わるのではなく安定化剤として作用していると考えた。一般に安定化剤として用いられている高分子は次のような機構により、コロイド粒子の凝集を防ぐことが説明されている。高分子溶媒におけるコロイド溶液の安定性は、高分子がコロイドに吸着することにより、ちょうど電気二重層のように、重なり部分のセグメント濃度の増加と考えられる。

E. 結論

以上、ナノサイズセンシングカプセルについて、II-VI 属半導体化合物を用いて合成法、サイズの単一化、籠状ネットワーク構造の構築などについて成果を得た。一方シリカコーティングについては蛍光/PS_t 粒子を用いて実験してきたが、今後も最適なシリカコーティングの条件を決定して、動物実験に移して行く予定である。又磁性微粒子についてもコバルト、

ニッケルを中心とするナノサイズの粒子
を作製した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kasuya A, Milczarek G, Dmitruk I, Barnakov Y, Czajka R, Perales O, Liu X, Tohji K, Jeyadevan B, Shinoda K, Ogawa T, Arai T, Hihara T, Sumiyama K, Size- and Shape-controls and Electronic Functions of Nanometer-scale Semiconductors and Oxides, Colloids and Surfaces A 202 (2002) 291-296

2) Tsunekawa S, Kang J, Kasuya A, Blueshifts in the Ultraviolet Absorption Spectra of Amphoteric SnO_{2-x} Nano-crystalline Particles J. Appl. Phys. 91 (2002) 10098-10102

3) Czajka R, Hihara T, Kasuya A, Liu X, Sumiyama K, STM and STS Investigations of Transition Metals' Clusters (CR,

CoCr, Ni) Produced by the Plasma Gas Condensation, Colloids and Surfaces A 202 (2002) 196-205

4) Kondo D, Sakamoto K, Takeda H, Matsui F, Amemiya K, Ohta T, Wchida W, Kasuya A, Unoccupied Molecular Orbitals of C60 Molecules Adsorbed on Si(001)-(2X1) and Si(111)(1X1) Surfaces Studied by NEXAFS, Surface Science 514 (2002) 337-342

5) Jeyadevan B, Chinnasamy CN, Perles-Prez Y, Iwasaki Y, Hobo A, Shinoda K, Tohji K, Kasuya A, Synthesis and Magnetic Properties of Core-shell Structured (NiCo)₀(AFM) -NiCo(FM) Magnetic Nanoparticles, IEEE Transactions on Magnetics, VOL. 38, (2002) 2595-2597

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

研究代表者に同じ

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
（分担）研究報告書

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用
蛋白質結合型ナノ・カプセルの開発及び細胞マーキングへの応用
（分担）研究者 佐竹 正延 東北大学加齢医学研究所

研究要旨

蛋白質結合型ナノ・カプセルの開発及び細胞マーキングへの応用を目指して、癌細胞のマーキングの分野に関する研究を開始した。粕谷が作製した、Cd-Se クラスタのSiO₂ コーティング物質について蛋白質結合の反応条件を種々試み、結合のための最適化を検討した。同時に市販のナノ半導体化合物 Qdot を用いて正常細胞、癌細胞で接着分子、細胞骨格分子などの蛍光染色を行った。

A 研究目的

本研究はフラーレン・ネットワーク、コーティング剤を薬剤のカプセルとして用いることで、これまでにない高効率な医療検査試薬を創製することを目的とする。筆者らはナノサイズセンシングカプセルを用いて *in vivo*, *in vitro* における新たな用途の検討により分子標的検査法の確立および更なる遺伝子検査の開発を目標に据えて研究を行った。

B 研究方法

研究方法=ヒト乳癌由来培養癌細胞は、チロシンキナーゼレセプター型膜蛋白質HER2タンパクが発現しているBT474を用い、そのモノクローナル抗体（商品名ハーセプチン）を癌細胞認識抗体としてCd-Seナノカプセルに結合させ、癌細胞のマーキングに用いる。
また、本研究の将来的な応用開発には各種生物の遺伝子解析が必須である。筆者は脊椎動物で使われるボディ・プランの

プロトタイプを作った動物として、進化上に重要な位置を占める、ホヤ・脊索動物の1つのゲノム解読プロジェクトに参加した。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ動物、人体を対象とした実験を行っていないため倫理的問題は生じない。

C 研究結果

市販のquantum dotsと抗腫瘍モノクローナル抗体ハーセプチンを結合させたマーカーを用いて培養細胞の表面抗原をマーキングし、蛍光顕微鏡による観察に成功した。

ホヤ・ゲノムには抗原特異的な獲得免疫能に対応する遺伝子は存在しないこと、しかし自然免疫能を担うと思われる遺伝子が豊富に備わっていることを明らかにした。また細胞のアポトーシスを制御する遺伝子群は、線虫のそれよりはずっ