

と数が多く、むしろヒトのそれに近いことを見い出した。アポトーシスは細胞分化と発生、癌化、老化等に密接に関与する現象である。以上によりホヤが、自然免疫能及びアポトーシス研究の上で、有用なモデル生物なりうることを示唆することができた。

D 考察

臨床応用に向けた次の段階として、BT474 をヌードマウスに移植し、*in vivo* で Qdots 結合抗腫瘍モノクローナル抗体ハーセプチンを用いての蛍光画像計測実験を行いたい。また同時にセンシングナノカプセルの有効性、安全性を検証して行きたい。

さらに他の遺伝子解析を通じて分子マーカーとしてのセンシングナノカプセルの新たな応用法を検討していきたい。

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効率のよい分子マーカーとして利用可能であることがわかった。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

4. 論文発表

1) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Kitagawa D, Nishitai G, Seo J, Tanemura

S, Shimizu N, Kishimoto H, Wada T, Aoki J, Arai H, Iwatsubo T, Mochita M, Watanabe T, Satake M, Ito Y, Matsuyama T, Mak TW, Penninger, JM, Nishina H, Katada T, SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis. *Dev. Biol.* 250:332-347, 2002.

2) Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani, N., Kobayashi S, Satake M, Takada K, Komori T.

Core-binding factor b interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nature Genet.* 32:633-638, 2002.

3) Dehal P, Satou, Y, Campbell RK, -- Satake M, (the 25th among the 87 authors) --- Levine M, Satoh N, Rokhsar D. The draft genome of *Ciona intestinalis*: Insights into chordate and vertebrate origins. *Science.* 298:2157-2167, 2002.

4) Shida K, Terajima D, Uchino R, Ikawa S, Ikeda M, Asano K, Watanabe T, Azumi K, Nonaka M, Satou Y, Satoh N, Satake M, Kawazoe Y, Kasuya A, Hemocytes of *Ciona intestinalis* express multiple genes involved in innate immune host defense. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 302:207-218, 2003.

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
高感度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 小林 正樹 東北工業大学 助教授

研究要旨

ナノセンシング・カプセルの蛍光造影による癌センチネルリンパ節生検を目的とした、画像計測技術、画像分析手法の研究開発を行った。ラットを対象とした動物実験用蛍光画像計測システムを構築し、市販の各種蛍光粒子を用いることにより、生体組織の光学特性により決まる最適励起波長、最適観察波長および最適粒子サイズに関する基礎データの取得と、画像計測法の基礎検討を行った。

A. 研究目的

皮下組織に集積したナノセンシング・カプセル粒子からの蛍光を、体表から非侵襲的に計測するための蛍光画像計測・分析技術の研究開発を行う。14年度は、市販の各種蛍光ビーズを用い、生体組織の光学特性により要請される最適励起波長、最適観察波長および最適粒子サイズに関する基礎データの取得を行うための、ラットリンパ節造影用画像計測システムを構築する。これによりナノセンシング・カプセル設計グループへの設計データの提供を行うとともに、生体内蛍光画像計測のための技術的問題とその解決方法について検討を行う。

B. 研究方法

可視～近赤外波長領域における励起～蛍光画像計測システムを構築した。各種の粒子径および蛍光波長を有する市販蛍光粒子を用いて、それぞれの条件において画像計測実験を行った。また、皮膚や

内臓組織の自家蛍光スペクトルを分析し、生体内において蛍光粒子分布を観測するために最適な波長帯を検索した。

（倫理面への配慮）

動物実験は全て麻酔下で行い、動物愛護に十分配慮した。

C. 研究結果

励起波長473, 633, 660, 780nm, 蛍光画像計測波長領域400～900nmの性能をもつ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を構築した。これを用いて、ラットそ頸部リンパ節造影による画像計測実験を行った。各種蛍光波長およびサイズの蛍光粒子を末梢注射後、蛍光画像の連続計測および蛍光スペクトルの同時計測を行った。これにより注射後のリンパ節への粒子の集積に要する時間と粒子サイズの関係に関するデータを得た。また自家蛍光スペクトルと蛍光粒子スペクトルとの比較から、

最適な蛍光観察波長に関するデータを得た。

D. 考察

各種励起波長下における皮膚および体毛自家蛍光スペクトルの比較により、赤～近赤外波長領域（680nm以上）での観察が有効であるとの考察結果を得た。また、ラットそ頰部リンパ節造影においては、最適励起～観察波長帯を選定し、それに適した狭帯域および励起光阻止能の高い光学フィルターと高量子効率CCDカメラを使用することにより、蛍光画像計測が容易に実現可能であることがわかった。今後、より深部からの蛍光観察および空間分解能の向上のため、同時多波長分光によるスペクトル情報や時間分解による蛍光寿命情報を利用した画像計測法の開発が必要である。

E. 結論

14年度目標とした動物実験用計測システムの構築とナノセンシング・カプセル

の設計に必要な各種基礎データの取得に成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

鈴木, 小林, 武田, 中島, 多田, 大内, ”ラットリンパ節造影のためのレーザ励起蛍光画像計測システムの開発”, 第1回東北地区若手研究者研究発表会(2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
「蛍光画像計測装置」(予定)
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

F. 健康危険情報

なし

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）
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
（分担）研究者 石田 孝宣 東北大学医学部附属病院助手

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、ナノサイズセンシングカプセルの最適な蛍光波長の決定とコーティングビーズの作製と有用性、安全性評価のための動物実験を行い、ビーズの最適な蛍光特性、サイズを決定した。

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排除し、技術の確立を目的とする。

特に造影剤を用いたCT、MRIは乳癌病変の広がり診断に大きな力を発揮し近年主流となっている乳房温存手術の適応や切除範囲決定に極めて有用であることがわかってきた。本研究において創製されるアレルギーのない造影剤は患者に安心して投与できるため、今後臨床の場に切望されている薬剤であることに間違いない。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およびさらに多くの画像診断への応用を目的として、まず蛍光計測において最適な波長、サイズを決定する実験に協力し、さらに従来の画像診断の適応を拓げる研究が将来的にセン

シングナノカプセルの利用拡大に直結できると考え、本年度の研究を行った。

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および新規造影剤に応用するべく、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行う。
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. 現在医療の場に用いられているCT、MRIの利用範囲拡大を目指し、乳がん

の広がり診断についてそれぞれの有用性について検討する。具体的には下記の検討を行う。

対象は2000年～2002年に東北大学付属病院で手術を受けた初発乳癌患者52例。術前に患側乳房のhelical CT および MRI 検索を施行し、コンピューター画像処理による三次元構築により乳管内進展と多発病巣の存在を予測した。これらと摘出標本の詳細な病理検索結果とを対比させ、その精度を比較検討するとともに画像診断で多発病巣の存在が示唆された症例で、その局在が明らかであった部位の病理組織診断結果を検討した。

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。また、CT、MRIによる画像診断は保険で認められており、倫理面での問題はないと考える。

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。

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、安全性の検討を行い、将来的に乳癌の局所的広がり診断等の臨床試験に応用すべく研究を進める予定である。

3. CT、MRIの利用拡大：1) 病理診断にて2cm以上の高度な乳管内進展を認

めたのは17例でその感度、特異度、正診率はCT 65%, 97%, 87%, MRI 71%, 94%, 87%であった。2) 病理診断にて実際に多発病巣を認められたのは8例でその感度、特異度、正診率はCT 63%, 93%, 88%, MRI 75%, 80%, 79%であった。3) 高度な乳管内進展をCT, MRIともに捉えられたのは11例で、そのうち8例が comedo type、また、histological grade では11例中9例が I I 以上であった。4) 多発病巣に関する画像上の false positive はCT 2例、MRI 6例で、このうち局在が確認された病変の病理組織像は adenosis, sclerosing adenosis, proliferating disease without atypia (PDWA)などの増殖性病変であった。

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。また高度な乳管内進展病巣の描出感度においては3-D MRI が3-D CTよりもやや優れていたが、多発病巣に関しては3-D MRI で特異度が劣り、overdiagnosis となる傾向が認められた。画像上 false positive となった病巣の病理診断は、adenosis, sclerosing adenosis, PDWA が大部分を占め、増殖性病変と癌病巣との鑑別のための至適撮影条件の追求が必要と考えられた。今後も研究を進め、さらに新しい臨床応用や新しい診断技術の開発が期待されるの道を探っていきたい。

F 健康危惧情報

現在までのところ、動物を対象としたセンチネルリンパ節生検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。

また現在のところCT、MRIに用いる造影剤について重大な健康危惧情報は出されていない。

G 研究発表

8) 論文発表

1) Ishida T, Furuta A, Moriya T, Ohuchi. N, Pathological assessment of intraductal spread of carcinoma in relation to surgical margin state in breast conserving surgery. J J Clin Oncol 2003, in press.

2) Tamaki Y, Akashi-Tanaka S, shida T, Uematsu T, et al. Study group for 3D-imaging diagnosis of intraductal component of breast cancer. 3D imaging of intraductal spread of breast cancer and its clinical application for navigation surgery. Breast Cancer 2002; 9: 289-295.

3) 石田孝宣、大内憲明：乳癌手術療法（温存療法）の完成度。臨床外科、57, 283-288, 2002

5) 武田元博、石田孝宣、大貫幸二、大内憲明：乳癌の新しい治療戦略。外科治療、vol.87 No.6 630-634, 2002

9) 学会発表

なし

II. 知的財産権の出願登録状況

なし

別紙 1

雑誌論文 (2002～2003年)

発表者氏名	連名著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	号	開始頁	終了頁	出版年
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
Yoshida R	Ohuchi N, Kimura N	Clinicopathological study of chromogranin A, B and BRCA1 expression in node-negative breast carcinoma	Oncology Reports	9	8	1363	1367	2002
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
Tamaki Y	Akashi-Tanaka S, Ishida T, Uematsu T, Kusama M, Sawai Y, Nakamura S, Hisamatsu K, Tanji Y, Sato Y, Matsuura N	3D-Imaging diagnosis of intraductal spread of breast cancer and its clinical application for navigation surgery	Breast Cancer	9	4	289	295	2002
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 Quality Health Care	14	6	449	461	2002
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)					2003

大内憲明	武田元博、川添良幸、佐竹正延、粕谷厚生	クラスタ利用ナノ医療	ナノ学会会報 (in press)						2003
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 (in press)						2003
武田元博	石田孝宣、大貫幸二、大内憲明	乳癌治療の最前線ー乳癌の新しい治療戦略	外科治療	87	6	630	634		2002
Kumar V.	Kawazoe Y.	Metal-encapsulated Caged Clusters of Germanium with Large Gaps and Different Growth Behavior than Silicone	Phys. Rev. Lett.	88		235504-1	235504-4		2002
Sun Q.	Wang Q., Briere T.M., Kumar V., Kawazoe Y.	First-principle Calculations of Metal Stabilized Si20 Cages	Phys. Rev. B	65		235417			2002
Sun Q.	Wang Q., Kawazoe Y., Jena P.	Design of a Heterostructure Peapod Using Magic Silicon Clusters	Phys. Rev. B	66		245425			2002
A. Kumar S.	Kumar V., Briere T.M., Kawazoe Y.	Cluster Assembled Metal Encapsulated Thin Nanotubes of Silicon	Nano Letters	2	11	1243	1248		2002

Kasuya A.	Milczarek G. ; Dmitruk I., Barnakov Y., Czajka R., Perales O., Liu X., Tohji K., Jayadevan B., Shinoda K., Ogawa T., Arai T., Hihara T., Sumiyama K.	Size- and Shape-controls of Nanometer-scale Semiconductors and Oxides	Colloids and Surfaces	A	202		291	296	2002
Tsunekawa S.	Kangl., Kasuya A.	Blueshifts in the Ultraviolet Absorption Spectra of Amphoteric SnO ₂ -x Nano-crystalline Particles	J. Appl. Phys.		91		10098	10102	2002
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		A202		196	205	2002
Kondo D.	Sakamoto K., Takeda H., Matsui F., Amemiya K., Ohta T., Wchida W., Kasuya A.	Unoccupied Molecular Orbitals of C ₆₀ Molecules Adsorbed on Si(001)-(2x1) and Si(111)(1x1) Surfaces Studied by NEXAFS	Surface Science		514		337	342	2002
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		38	5	2595	2597	2002

Watanabe, T	Nakagawa, K, Ohata, S, Kitagawa, D., Nishitai, G., Seo, J., Tanemura, S., Shimizu, N., Kishimoto, H., Wada, T., Aoki, J., Arai, H., Iwatsubo, T., Mochita, M., Watanabe, T., Satake, M., Ito, Y., Matsuyama, T., Mak, T. W., Penninger, J. M., Nishina, H., and Katada, T.	SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis.	Dev. Biol.	250	332	347	2002
Yoshida, C. A.	Furuchi, T., Fujita, T., Fukuyama, R., Kanatani, N., Kobayashi, S., Satake, M., Takada, K. and Komori, T.	Core-binding factor β interacts with Runx2 and is required for skeletal development.	Nature Genet.	32	633	638	2002
Dehal, P.	Satou, Y., Campbell, R.K., -- Satake, M. (the 25th among the 87 authors) --- Levine, M., Satoh, N. and Rokhsar, D.	The draft genome of <i>Ciona intestinalis</i> : Insights into chordate and vertebrate origins.	Science	298	2157	2167	2002
Shida, K.	Terajima, D., Uchino, R., Ikawa, S., Ikeda, M., Asano, K., Watanabe, T., Azumi, K., Nonaka, M., Satou, Y., Satoh, N., Satake, M., Kawazoe,	A. Hemocytes of <i>Ciona intestinalis</i> express multiple genes involved in innate immune host defense.	Biochem. Biophys. Res. Com.	302	207	218	2003

別紙 2

学会発表 (2002～2003年)

発表者氏名	連名著者氏名	発表タイトル	学会名	場所	年月日
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
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回メテイクアル インフォマテック アシンボジウム	東大駒場先端 科学技術 研究セン ター、東京	2003年3月27日
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
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	28-Jan-03
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
Takeda M.	Ohuchi N., Nakajima M., Tada H., Kobayashi M.	Innovative Cancer Imaging by Biophoton Emission	Nanomedicine Workshop	University of Hawaii at Manoa, Honolulu	March 19-20, 2003

武田元博	高山昌理子、中島護、小林正樹、楊真宣、大内憲明	乳腺腫瘍の生物フォト画像計測 I — 腫瘍の生物フォト画像と組織像のフォト画像と組織像の相関 —	第61回日本癌学会総会	東京	平成14年10月2日
高山昌理子	高山昌理子、中島護、小林正樹、楊真宣、大内憲明	消化器癌切除標本の生物フォト画像計測 I	第61回日本癌学会総会	東京	平成14年10月2日
鈴木聡	小林正樹、武田元博、中島護、多田寛、大内憲明	ラットリンパ節造血のたのめのスレーザ画像計測システムの開発	第1回東北地区若手研究者研究発表会	仙台	平成15年2月26日

20020769

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。