

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。ネットワーク物質として2年度は II-VI 族半導体及び磁性体に加え、より無毒と予測されるシリコンについても微粒子作製と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生体分子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標識としてナノサイズの高機能微粒子を用いたナノ医療技術を開拓する。この高機能微粒子を生体内の分子や組織に結合させて静的、動的な状態を詳細に捉えることにより、様々な機能の仕組み、異常、疾患が非破壊且つ遠隔的に認識可能となる。

当「無機半導体ナノサイズ・センシングカプセルの合成」グループは、標識として従来より用いられてきた蛍光性有機色素に換えて無機半導体を選んだ。これにより、欠点とされたセンシングの感度、精度、多様性、耐久性が飛躍的に向上することを目指して研究を開始した。初年度は広範な物質探索とシリカによるカプセル化技術の取得に主力を注いだ。次年度では機能性の強化、毒性の除去を実

現する微小新物質の開拓を進めた。

B 研究方法

*直径 5nm 以下の蛍光性カプセル状微粒子の作製と評価

初年度に合成したII-VI族化合物半導体微粒子についてセンシングの性能を向上させるため、CdSeについて直径 5nm以下の粒子の作製を試みた。これにより、顕著な量子閉し込め効果に由来する光吸収係数の増大、発光スペクトルの先鋭化、効率の増強などを図ることか出来る。

CdSeは CdS、CdSe、ZnS、ZnSe、等の他のII-VI族化合物半導体と同様に可視光領域で効率よく発光する特性を有するために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。

蛍光性有機分子と異なり、原子か一様に3次元的に配列した無機物であるために立体的に安定で光照射による特性の劣化が小さい。

また可視光領域における蛍光の量子効

果は一般に直径が3nm以下から顕著となり、CdSeでは1nmまで小さくすると赤から黄緑まで変化する。一方有機分子は化学組成を変えない限り発光波長は殆ど変化しない。しかも1次元或いは2次元的構造でしかも蛍光する部位が化学的に不安定な場合が多く、光照射による劣化が激しい。

* 逆ミセル法による(CdSe)_nの作製

極微小な試料を作成するため、逆ミセル法を採用した。即ち界面活性剤を有機溶媒中に導入して凝集させ、中心にナノメータの反応空間を作る。このナノ空間においてCdSe微粒子を成長させた。

先ず、Cd₂SO₄とNa₂SeSO₃の水溶液に界面活性剤CH₂(CH₃)₉NH₂を入れる。この溶液にトルエンを注くと、界面活性剤がトルエン中に集まって逆ミセルを形成する。その中心に約1.5nmの直径の空間が出来ることが、トルエンは油性であるために界面活性剤は親水基を中心に向けて凝集している。この中に水溶性のCdとNaのイオンがとけ込んで直径1.5nmのCdSeの微粒子が出来ることがわかった。

逆ミセルの中心の大きさは温度や界面活性剤の濃度によって変わる。このことを利用して(CdSe)₁₃と(CdSe)₄₈も作ることが出来た。(CdSe)_nのnが13、33、34、48等と限られた値になるのは、(CdSe)_nにとつ極めて安定な数に相当するからである。

逆に他の値では非常に不安定なために逆ミセルの中で成長することは出来ず、選択的にn=13、33、34、48が合成されることになる。このように原子数まで揃った

微粒子は化合物では初めてであり、元素としてはC₆₀に続いて2例目である。

* 電極腐食によるシリコン微粒子の作製

シリコンも炭素と同様に安定な物質で、生体への害も少ないと考えられる。ハルクでは発光が赤外域にあるか、微粒子にすると可視領域に移動する。又我々の第一原理計算によっても安定なシリコン微粒子が存在することが示されている。

シリコンの微粒子はアーク放電、アルゴンスパッタリング、有機合成によっても作ることが可能と考えられるか、電気化学的な電極腐食によって作製することを試みた。

シリコン結晶を電極とし、対極に白金を用いて腐食を行った。電解液はアルコール、弗化水素、過酸化水素水である。電解液中に分散したシリコン微粒子を遠心分離によって仕分け、微小な粒子だけを取り出した。次に電解液をヘキサンで置換して数日放置した。この方法により、S₁₁₀-S₁₃₀の範囲の粒子を分離出来ることが質量分析で確かめられた。

C 研究結果

* (CdSe)_nの結果

得られた(CdSe)_n試料について発光スペクトルを測定したところ、(CdSe)₁₃は紫外域に、(CdSe)₃₃と(CdSe)₃₄は黄緑(450nm)に、(CdSe)₄₈は黄色(490nm)に発光のピークが観測された。同じ物質でありながら分子数が33或いは34から48に変わることにより、可視領域の異なる波長で発光することか確認された。この波長の違いは、二つの異なる発光体として充分両者を分離して識別出来る差である。直径も1.5nmと1.7nmとDNAや蛋白質に比べて非

常に小さく、発光ピークも鋭く測定系を乱すことなく高精度な観察が行える。

* 第一原理計算による構造解析

安定な $(\text{CdSe})_n$ について、第一原理計算を行った。その結果、 $(\text{CdSe})_{13}$ 、 $(\text{CdSe})_{33}$ 、 $(\text{CdSe})_{34}$ 、 $(\text{CdSe})_{48}$ は、それぞれ $(\text{CdSe})_{12}$ 、 $(\text{CdSe})_{28}$ 、 $(\text{CdSe})_{28}$ 、 $(\text{CdSe})_{36}$ の籠状粒子の中に CdSe 分子が 1 個、5 個、6 個、12 個入って丁度 13、33、34、48 になっていることがわかった。そしてカプセル状の籠にあたる $(\text{CdSe})_{12}$ 、 $(\text{CdSe})_{28}$ 、 $(\text{CdSe})_{36}$ は、窒化硼素 $(\text{BN})_n$ の理論的モデルと同しであることがわかった。この構造は 2 種類の原子 (Cd と Se、又は B と N) が交互に繋がった 4 員環と 6 員環からなるネットワークで出来ている。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、 $(\text{BN})_{12}$ 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、 $(\text{BN})_{16}$ になる。次が 4 員環 6 個、6 員環 24 個の 30 面体で、 $(\text{BN})_{28}$ となる。

この様なカプセル構造の $(\text{CdSe})_n$ を幾つかのサイズで合成することが出来た。機能的な II-VI 族半導体でカプセル構造の粒子が見出されたことはナノ医療への幅広い応用を期待させる。

* S_{1n} 微粒子の結果

遠心分離とヘキサンの抽出で得られた S_{1n} について発光スペクトルを測定したところ、赤から青までの蛍光を観測できた。しかし n の値について $(\text{CdSe})_n$ 程、精度良く分離することは出来ず、更なる工夫が必要である。

D 考察

研究課題である「無機半導体ナノサイ

ズ・センシングカプセルの作製」に向けて、新しい微粒子を作製することが出来た。特に CdSe 粒子についてはカプセル状の粒子が見出された。

従来はフラーレンやナノチューブのように炭素元素に限られていた籠状の粒子が II-VI 族化合物のような一般的な化合物半導体で見付かったことになる。炭素元素は 6 員環による平面的ネットワークが容易に出来、C60 のような閉じた籠状のカプセルが合成できた。一般の化合物は 3 次元的であり、平面的に閉じる構造にはなり難いと考えられてきた。しかしナノメータサイズの微粒子では、表面は閉じた構造になることで安定になろうとする。このために籠状のカプセル構造が可能となることが明らかになった。

E 結論

以上の如く、物質はナノメータサイズにするとバルクでは実現せぬカプセル構造が可能になることがわかった。この構造の特徴を解析し、ナノ医療への応用を今後とも図ってゆく。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Variable temperature STM/STS Investigations of Ag Nanoparticles Growth on Semiconductor Surfaces
Acta Physica Polonica A, 104 (2003) 289-301

R Czajka, S Suto, P Lostak, S Suzba and A Kasuya

2 STM/STS Studies of Self-Organized Growth of Iron Silicide Nanocrystals on

- Vicinal Si(111) Surface
Acta Physica Polonica A, 104 (2003)
303-319
A Wawro, S Suto, R Czajka and A
Kasuya
- 3 Blue shifts in the Ultraviolet
Absorption Spectra of Cerium Oxide
Nanocrystallites
J Appl Phys 94 (2003) 3654-3656
S Tsunekawa, J -T Wang, Y Kawazoe and
A Kasuya
- 4 Electronic States of SnBr₄ Single
Crystal and of its Clusters Inserted in
the Molecular Vessel
of Cyclodextrin
J Phys Soc Jpn 72 (2003) 2224-2228
C J Ye, B Gombojav, T Yoshinari, S
Nagasaka,
Y Takahashi, A Yamamoto, T Goto and
A kasuya
- 5 Oxygen-Deficient Anatase
Precipitated from High-Temperature
Plasma
J Ceram Soc, 87 [1] (2004) 166-169
Y Kato, H Yokobayashi, A Kasuya, M
Kagawa, and M Kawasaki
- 6 Thermal Reaction of Iron with a
Si(111) Vicinal
Surface Surface Ordering and Growth of
CsCl-type Iron Sulfide
Phys Rev B67, (2003) 195401-1 -10
A Wawro, S Suto, R Czajka, and A
Kasuya
- 7 Ultra-stable Nanoparticles of CdSe
Revealed from Mass Spectrometry
Nature Materials 3,2(2004) 99-102
A Kasuya et al
- 2 学会発表
日本物理学会第 59 回年会、2004 年 3 月
27 日
安定な II-VI 族半導体ナノ粒子、(CdSe)₃₃
と(CdSe)₃₄の大量合成と構造解析
粕谷厚生他
- H 知的財産の出願・登録状況
研究代表者に同し

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

抗HER2抗体を結合したナノクリスタルによる、ヒト乳がん細胞のイメージング

（分担）研究者 佐竹 正延 東北大学加齢医学研究所

研究要旨

抗HER2抗体を結合したナノクリスタルによる、ヒト乳がん細胞のイメージングへの応用を目指してCdSeナノクリスタルによる抗HER2モノクローナル抗体の標識を行い、培養乳がん細胞に発現した表面抗原分子HER2を *in vitro* でマーキングすることに成功した。続いて行った培養細胞を移植した担癌マウスへの標識抗体の投与ではがん部に極僅かなシグナルを示すのみで、体外診断の目的に照らして満足のいく結果ではなかった。今後、ナノクリスタルの改良による蛍光強度の増強や安定性の向上、標識方法の最適化などを検討することにより生体内イメージングとしての利用を可能にする。

A 研究目的

CdSeナノクリスタルは従来の有機蛍光色素に比べ、蛍光寿命・蛍光強度ともに格段に優れた特性を有する。従って分子修飾したナノクリスタルを用いて、がん細胞を特異的に標識できれば、がん診断手技の上でより強力な選択肢を提供することも可能である。本研究ではヒト乳がん細胞をモデル系に選び、がん細胞が高発現する膜蛋白であるHER2を指標とするために、CdSeナノクリスタルに抗HER2抗体を結合させた。このようにして作製した機能性ナノクリスタルのがん細胞への結合活性を *in vitro* 及び *in vivo* で測定した。

B 研究方法

CdSeナノクリスタルはエピデントテクノロジー社より販売されているEviTagを使

用した。EviTagはCdSe/ZnS、コア/シェル型のナノクリスタルがカルボキシル基を持ったポリマーによりコーティングされている生体分子標識用に調製された製品で、抗体を標識するのに適していると考えられた。抗HER2モノクローナル抗体は中外製薬(株)より治療用に販売されている抗悪性腫瘍剤ハーセプチン（抗HER2ヒト化モノクローナル抗体）を研究用として購入し、使用した。CdSeナノクリスタルと抗HER2抗体の結合は市販の架橋剤EDCとsulfo-NHS（ともにPIERCE）を使用して行った。また、*in vivo*実験に用いる際にはナノクリスタルの性状をより親水性に近づけ、生体内における循環を促すためにポリエチレングリコール誘導体（メトキシ-ポリエチレングリコール-アミン、Fluka）による修飾も行った。標的となるヒト乳がん細胞としては培養乳がん細胞

株KPL-4（川崎医科大、紅林博士提供）を使用した。KPL-4細胞株はエストロゲン非依存的な増殖が可能であるため、*in vivo*における移植がん細胞の増殖が容易であることから選択した。*in vitro*ではKPL-4細胞をカバーガラス上で培養し、ホルマリン固定、もしくはEDTAの添加により浮遊させた細胞をPBS中で遠心、回収し、適当に希釈したナノクリスタル-抗HER2抗体コンジュゲートと反応させることによりHER2の染色を行った。*in vivo*実験では6～12週齢のヌードマウスに 8×10^6 個のKPL-4細胞を移植し、数週間後、腫瘍が100-200mm³に達してから使用した。個体へのナノクリスタル-抗HER2抗体コンジュゲートの投与は尾静脈から慎重に行った。培養細胞の蛍光の観察は共焦点レーザー顕微鏡を使用し、個体の蛍光の観察は高性能CCDカメラとダイオードレーザーを搭載したレーザー励起イメージングシステムを使用した。

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画した。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ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しない。また、動物モデルを用いた実験を開始したか、本学の動物実験施設の許可を受け、動物実験指針にのっとり行っている。

C 研究結果

CeSeナノクリスタルを抗HER2抗体にコンジュゲートし、培養乳がん細胞を*in vitro*で染色することに成功した。また、乳がん細胞移植マウスに投与したコンジュゲートは非常に微量ながら乳がん細胞塊近傍に移行した。ただし、大半のコンジュゲートは網内系組織に捕捉され、乳がん細胞へ辿り着くことができなかった。

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と数が多く、むしろヒトのそれに近いことを見出した。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結果を得ることができた。

D 考察

ここで作製したCdSeナノクリスタル-抗HER2抗体コンジュゲートは*in vitro*においてKPL-4細胞が発現する細胞表面蛋白HER2を認識、結合し、共焦点レーザー顕微鏡下で蛍光として観察されることが示された。しかしながら、*in vivo*ではシグナルがほとんど見えなかった。原因のひとつとしては、ほとんどのコンジュゲートが乳がん到達する以前に網内系に取り込まれてしまうことによる量的な不足が考えられる。また、抗体のナノクリスタ

ルへの結合様式の不適合による抗体分子の結合活性の低下も原因として予想される。前者は現在使用している市販のナノクリスタル (EviTag) の粒子表面の性質 (コーティングポリマーの性質) に依存している可能性が高いため、このことが原因として裏付けられれば、今後は異なる性質のポリマーによる自家製のコーティングを検討する必要が生ずる。後者は抗体がナノクリスタルと結合する際に抗原認識部位近傍のアミノ基を使用しているために抗原との結合活性が失われている場合や、標識反応操作によって一部の抗体が変性するなどして結合活性が失われている可能性が考えられる。変性については反応温度をできるだけ低く抑え、反応時間を延長するなどの対応が有効であるかもしれない。また、抗原認識部位近傍でのコンジュゲーションについては同じ反応系でコンジュゲートを作製する限りにおいては防ぎようのない現象であるため、抗体分子のスルフィドリル基を使用した結合に変更するなど大幅な改良が必要とされる。抗体の結合基とナノクリスタルのコーティングポリマーの種類の問題は関連付けて考慮することが必要である。

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。今後さらに新しい用途や診断技術の開発に向けて研究を継続する。

F 健康危険情報

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しない。

G 研究発表

3 論文発表

- 1) 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
- 2) Komine O, Hayashi K, Natsume W, Watanabe T, Seki Y, Seki N, Yagi R, Sukzuki W, Tamauchi H, Hozumi K, Habu S, Kubo M and Satake M, The Runx1 transcription factor inhibits the differentiation of naive CD4+ T cells into the Th2 lineage by repressing *GATA3* expression *J Exp Med* 198 51-61, 2003
- 3) Sato T, Ito R, Nunomura S, Ohno S, Hayashi K, Satake M and Habu S Requirement of transcription factor AML1 in proliferation of developing thymocytes *Immunol Lett* 89 39-46 2003
- 4) Ehlers M, Laule-Kilian K, Petter M, Aldrian CJ, Gruter B, Wurch A, Yoshida N, Watanabe T, Satake M and Steimle V, Morpholino antisense oligonucleotide-mediated gene knockdown during thymocyte development reveals role for Runx3 transcription factor in CD4 silencing during

development of CD4-/CD8+ thymocytes J Immunol 17 3594-3604, 2003

5) Azumi K, De Santis R, De Tomaso A, Rigoutsos I, Yoshizaki F, Pinto M, Marino R, Shida K, Ikeda M, Ikeda M, Arai M, Inoue Y, Shimizu T, Satoh N, Rokhsar D, Du Pasquier L, Kasahara M, Satake M and Nonaka M, Genomic analysis of immunity in a urochordate and the emergence of the vertebrate immune system waiting for Godot Immunogenet 55 570-581, 2003

6) Terajima D, Yamada S, Uchino R, Ikawa S, Ikeda M, Shida K, Arai Y, Wang H-G, Satoh N and Satake M, Identification and sequence of seventy-nine new

transcripts expressed in hemocytes of *Ciona intestinalis*, three of which are possibly involved in characteristic cell-cell communication DNA Res 10 203-212, 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）

（総括・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（H14・ナノ 010）

高感度蛍光検出法の開発

（主任又は分担）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。蛍光微粒子からの蛍光を選択的に検出するための分光イメージング法、および蛍光寿命イメージング法に関する検討とシステム構築を行った。

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。15年度は、各種蛍光ビーズおよび量子ドットを用い、最小検出感度を決定する生体組織の自家蛍光弁別方法について、昨年度ラットにより測定した分光データをもとに検討を行う。具体的には、分光スペクトル情報の2次元分布を取得するための分光イメージングシステムを試作し、また同時に、量子ドットのもつ長蛍光寿命特性を利用した蛍光イメージング法の検討を行う。これにより微量計測を実現し、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フィードバックを行う。さらに生体内蛍光画像の高空間分解計測のための技術的問題とその解決方法についての検討を行う。

B 研究方法

可視～近赤外波長領域における蛍光分光イメージングシステムを構築した。自家蛍光スペクトル分布と蛍光微粒子由来スペクトル分布との分布パターンの違いを特徴抽出することにより、ターゲット蛍光微粒子の空間分布を高感度に検出するため、ファントム試料による画像計測実験を行った。また、量子ドットの蛍光寿命計測を行い、蛍光寿命イメージング計測法についての検討を行った。

（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

励起光ライン走査により発生する蛍光をポリクロメータにより分光し、イメージンシファイアを介した高感度CCDにより1次元分光スペクトルを得る。これを励起光走査と同期して順次2次元検出することにより2次元面上における分光スペクトルを計測する。このような

機構に基づく分光イメージングシステムを試作した。これを用い、生体組織に埋められた蛍光物質分布を生体組織の自家蛍光と分離する蛍光分光画像分析法について、ファントムを用いた実験を行い、その分析アルゴリズム、ソフトウェアの開発・検討を行った。その結果、従来のフィルターによる単一波長分離法と比較して、本手法の有効性を確認した。また、各種量子ドットの蛍光寿命を分析するための時間相関単一光子計数システムを構築し、その蛍光寿命を測定し、蛍光寿命イメージングシステムの基本設計を行った。

D 考察

生体内蛍光物質分布を高感度計測する上で、その検出限界を決定するのは組織自家蛍光由来ショット雑音であり、従って、自家蛍光の分離がその微量計測にとって重要である。そのための方法として、スペクトルパターンによる分離と蛍光寿命による分離の2つの視点からのアプローチを行った。本年度はスペクトルパターンによる分離を行うための分光イメージングシステムを試作したが、この結果をふまえ次年度は蛍光寿命イメージングをこれと併用することにより、さらなる高感度化を図る。また、空間分解能を改善するための各種の方法についても今後検討を行い、より深部での蛍光画像計測の実現をめざす。

E 結論

15年度目標とした高感度蛍光画像計測システムの試作とその実験的検証を行い、その有効性を確認した。

F 健康危険情報 なし

G 研究発表

1 論文発表

S Yamaguchi, H Isejima, T Matsuo, R Okura, K Yagita, M Kobayashi, H Okamura Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus, *Science*, Vol 302, No 5649, pp 1408-1412 (2003)

M Kobayashi Modern technology on physical analysis of biophoton emission and its potential extracting the physiological information In *Energy and Information Transfer in Biological System* (F Musumeci, L S Brizhik and M W Ho eds) pp157-187, World Sci Pub, Singapore (2003)

H Terazono, T Mutoh, S Yamaguchi, M Kobayashi, M Akiyama, R Udo, S Ohdo, H Okamura, S Shibata Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver, *PNAS*, Vol 100, No 11, pp 6795-6800 (2003)

2 学会発表

近藤清貴, 佐々木研輔, 小林正樹, 江原淑夫, 榎本幹 生物フォトン時空間特性分析による植物葉の熱ストレス応答の計測, 平成16年度東北地区若手研究者研究発表会 講演番号 YS-2 19, 講演資料 p37 (2004)

佐々木研輔, 近藤清貴, 小林正樹, 江原淑夫, 榎本幹 生物フォトン時空間特性分析による植物葉のウイルス感染抵抗反応分析法の検討

平成16年度東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS 2 20, 講演資料 p39 (2004)

笠松隆史, 小林正樹, 榎本幹 コヒーレント検出法による光散乱媒質中における超音波分布のイメージングⅡ, 平成16年度東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-2 21, 講演資料 p41 (2004)

渋谷幸弘, 小林正樹, 榎本幹 散乱媒質中における蛍光物質分布の画像計測法の基礎検討,
平成 16 年度東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS 2 51 講演資料 p101 (2004)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 榎本幹 超
高感度 CCD による悪性腫瘍由来生物フォトン
発光の *in vivo* 画像計測, 平成 16 年度東
北地区若手研究者研究発表会, 講演番号
YS 2-52, 講演資料 p103 (2004)

藤原修一, 奥山智浩, 小林正樹, 榎本幹
ヒト体表における生物フォトン 2 次元発光
画像計測システムの開発, 平成 16 年度東北
地区若手研究者研究発表会, 講演番号
YS-2-53, 講演資料 p105 (2004)

深澤勝, 小林正樹, 榎本幹 極微弱発光の
光子放出時系列分析による光子統計特性分
析法の検討, 平成 16 年度東北地区若手研
究者研究発表会, 講演番号 YS 2 54, 講演資料
p107(2003)

武藤修, 鈴木聡, 奥山智浩, 遠藤雅史, 小
林正樹, 中島護雄, 多田寛, 武田元博, 大
内憲明, 榎本幹 蛍光微粒子を用いた生体機
能計測のための分光画像計測法の検討, 平
成 16 年度東北地区若手研究者研究発表会,
講演番号 YS 2 55, 講演資料 p109 (2004)

佐々木研輔, 小林正樹, 深沢勝, 江原淑夫,
榎本幹 生物フォトン 2 次元時空間特性分
析による植物葉における傷害の検出と分析
I - CO₂ レーザーによる熱傷害 - 平成 15
年秋季第 64 回応用物理学会学術講演会講
演予稿集, 論文番号 31p S 5, 11194 (2003)

笠松隆史, 渋谷幸弘, 小林正樹, 榎本 幹
コヒーレント検出イメージング法による光
散乱媒質中における超音波分布の可視化
平成 15 年度電気関係学会東北支部連合大
会講演予稿集, 講演番号 1B 06 (2003)

佐々木研輔, 深澤勝, 小林正樹, 江原淑夫,

榎本幹 植物のウイルス感染時における生
物フォトン発光の 2 次元時空間特性計測と
傷害に対する応答の分析, 平成 15 年度電気
関係学会東北支部連合大会講演予稿集, 講
演番号 1B-07 (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

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、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、並びに有用性、安全性評価のための動物実験を行った。さらに将来の応用を見据えたCT、MRIによる乳癌病巣の拡がり診断法の確立に向けた検討も行った。

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する技術の確立を目的とする。

特に造影剤を用いたCT、MRIは乳癌病変の拡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安全な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と言える。

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拡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、昨年引き続き研究を行った。

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、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蛍光検出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継続して行う。
- 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、粒径の計測を行い、動物実験をはじめとした実用化に向けた検討に協力する。
- 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、乳癌の拡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継続して行う。

対象はそれ以前の症例に続いて2003年以降、東北大学付属病院で手術を受けた初発乳癌患者。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結果、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国際特許を

出願した。この内容は平成15年度第104回日本外科学会にて報告予定である。

また粕谷、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、センチネルリンパ節造影に成功している。さらに現在最適な粒径・安全性について細かい条件の決定を行っている。

2 X線造影剤の開発 粕谷、小林芳男らと共に作製したヨード内包コーティングビーズを用いて有用性の検討を行った。その結果、ナノサイズシリカコーティングAgIビーズの懸濁液を従来のX線造影剤に匹敵するCT値に調製できた。現在動物実験を行い、有用性の検討を行い、特許出願の準備を進めている。

3 現在医療の場にも用いられているCT、MRIへの応用拡大の検討 1) 乳管内進展に関してはCTに比べてMRIの感度がやや高く、特異度は逆にCTのほうが高い結果を得た。2) 多発病変についても同様にCTに比べてMRIの感度がやや高く、特異度は逆にCTのほうが高い結果を得た。

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蛍光特性の検討並びに動物実験を行い、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の確立を今後も引き続き目指す予定であり、随時動物実験を行い、コーティングビーズの有効性、安全性を検証して行きたい。

2 X線造影剤の開発 現在まで粒径、X線透過特性の計測を行ったが造影剤として、CTはおおむね目標を達成してきたが、粒径は使用目的別に設定する必要がある。今後は動物実験によって必要な条件を探ると共に、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の応用拡大のための検討 これまでの検討の結果、1) 乳管内進展に関してはCTに比へてMRIの感度がやや高く、特異度は逆にCTのほうが高い結果を得ている。造影効果は造影剤の到達性、滞留性、細胞内への取り込み率等に影響される。われわれが開発中の造影剤は従来の造影剤とまったく異なる構造、粒径を持っているため造影効果に変化する可能性が高い。今後、粒径・表面の修飾基をさまざまに変える等、造影に最適な条件を模索したい。2) 多発病変についても同様にCTに比へてMRIの感度がやや高く、特異度は逆にCTのほうが高い結果を得ている。先に述べたごとく、さらに増殖性病変の鑑別が可能な従来のX線造影剤の短所を解決する造影剤を開発したい。

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か、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、X線造影剤の性状を最適なものとするこゝとてこれらの問題を解決する造影剤がてきる可能性がある。

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しない。

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

論文発表

1) Amari M, Moriya T, Harada Y, Ishida T, Ohnuki K, Takeda M, Sasano H, Horii A, Ohuchi N LOH analyses of asynchronous lesions of ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma Jpn J Clin Oncol, 33(11) 556-562, 2003

2) Ishida T, Ohuchi N, Moriya T, et al Pathological assessment of intraductal spread of carcinoma in relation to surgical margin state in breast conserving surgery Jpn J Clin Oncol, 33(4) 161-166, 2003

3) Ohuchi N, Ishida T, Ohnuki, Takeda M Advances in diagnosis of breast cancer mammography for screening and mri for breast-conserving surgery R Ros, T

Kakizoe (eds.) "Innovative achievements in cancer imaging" The 33rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund pp 30-34, 2003

4) Yang M, Moriya T, Oguma M, de la Cruz C, Endoh M, Ishida T, Hirakawa H, Orita Y, Sasano H, Ohuchi N
Microinvasive Ductal Carcinoma of the Breast The Clinicalpathologic Profile and Immunohistochemical Features of 28 Cases Pathol Int 2003 (in Press)

5) Takeda M, Ishida T, Onuki K, Suzuki, A, Sakayori M, Ishioka C, Nomizu T, Noguchi S, Matsubara Y Ohuchi N
Collaboration of Breast Cancer Clinic and Genetic Counseling Division for BRCA1 and BRCA2 Mutation Family in Japan Breast Cancer, 11(1), 30-32, 2004

6) Shiraishi K, Kato S, Han S-Y, Liu W, Otsuka K, Sakayori M, Ishida T, Takeda M, Kanamaru R, Ohuchi N, Ishioka C
Isolation of temperature-sensitive p53 mutations from a comprehensive missense mutation library J Biol Chem, 279 (1) 348-355, 2004

7) 鈴木昭彦、石田孝宣、森谷卓也、大内憲明、乳腺症と乳癌。産婦人科治療、87(6)、642-646、2003

学会発表

1) 石田孝宣、大貫幸二、武田元博、鈴木昭彦、田澤篤、中島護雄、宇佐美伸、多田寛、大内憲明、当科における非浸潤癌の乳癌温存療法の結果。第103回日本外科学会 平

成15年6月6日

2) 石田孝宣、大貫幸二、武田元博、大内憲明、当科における両側乳癌症例の検討。第11回日本乳癌学会 平成15年6月13日

3) 武田元博、石田孝宣、大貫幸二、酒寄真人、石岡千加史、野水整、野口眞三郎、福島雅典、松原洋一、大内憲明家族性乳がん保因者における遺伝子診療体系の確立。第11回日本乳癌学会 平成15年6月13日

4) 大貫幸二、石田孝宣、武田元博、鈴木昭彦、鈴木昭彦、宇佐美伸、大内憲明、初回受診者と繰り返し受診者の発見率から見た乳癌検診の精度管理、第13回日本乳癌検診学会 平成15年11月21日

5) 宇佐美伸、大貫幸二、石田孝宣、武田元博、鈴木昭彦、鈴木昭彦、大内憲明、検診発見の微細石灰化病変に対する診断方法についての検討、第13回日本乳癌検診学会 平成15年11月21日

II 知的財産権の出願登録状況
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）

白血球細胞マクロファージによる単一 CdSe ナノ粒子の貪食

（分担）研究者 樋口 秀男 東北大学大学院工学研究科 助教授

研究要旨

蛍光性のナノ粒子である蛍光ピースや CdSe 粒子は有機蛍光分子よりも蛍光を発する時間が長かつ蛍光光度が強いことから、生命科学や医療分野においてこれからの利用が注目されている。本研究では蛍光性ナノ粒子に対する細胞の反応を調べるため、白血球細胞の1つであるマクロファージの貪食機能に注目し、ナノ粒子に対するこの細胞の貪食を調べ、生体内に対する蛍光性ナノ粒子利用における有効点や問題点を検討した。

方法

非加熱 FCS10%培地、TPA 濃度 2nM、細胞数 3×10^4 個/ml、分化時間 48 時間で分化をかけたマクロファージに 10nm 及び 40nm カルボキシピースと IgG を結合させた IgG ピース(10)と IgG ピース(40)を同濃度で培地の中に入れた。貪食物質を入れ 24 時間後、位相差観察を行い外観判断のマクロファージ数、貪食を示したマクロファージ数、貪食した物質の数を調べた。

・ IgG ピース(10, 40)

1 μ m カルボキシピースと同様に EDC を用いた。4℃保存の 10 及び 40nm カルボキシピース原液 (10^{10} /ml, 50pM) 50 μ l と -80℃保存の粉状 EDC 0.4mg と純水 1ml を合わせた EDC 溶液 (6mM) 10 μ l を加え、室温で 15 分間反応させた。ここでの反応

は不安定なため、作業は素早く行った。

1ml の RPMI を加え 100K, 8min, 4℃で超遠心した後、上澄みを捨て塊を壊すため RPMI 100 μ l を加えて超音波をかけた。-20℃保存の IgG (0.2mg/ml) 1 μ l と RPMI 300 μ l を合わせた IgG 溶液 (0.7 μ g/ml, 5nM) 50 μ l を加え、室温で 2 時間反応させた。1ml の RPMI を加え 100K, 8min, 4℃で超遠心し、上澄みを捨て RPMI 100 μ l を加えて超音波をかけた。使用するときには、IgG ピース (10^9 /ml) 10 μ l と BSA (30mg/ml) 10 μ l と RPMI 80 μ l を合わせたものを用意した。

・手順

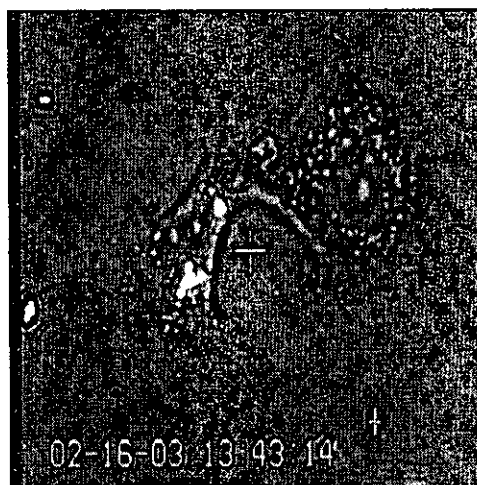
プレートに非加熱 FCS10%培地、TPA 2nM、細胞 3×10^4 個/ml、分化時間 48 時間で 2 つのサンプル（マクロファージ）を用意した。濃度 10^8 /ml に調整した 10nm

と40nmカルボキシビーズを培養液の中に入れ、再び24時間インキュベートした。サンプルステージを42℃に設定し、プレート外から培養液中を60×10倍で位相差観察と蛍光観察し、外観によるマクロファージの数と貪食をしているマクロファージの数また貪食された物質の数を調べた。

結果及び考察

貪食したマクロファージとその蛍光画像及び蛍光の全体像を図に示した。今までと同様に、10nm、40nm共に外観によるマクロファージは2割ほどであったか、約9割のマクロファージが貪食を示していた。しかし、貪食された粒が目に見えるほどの大きさをしており、これは明らかにナノサイズの粒ではなく、ビーズが凝集したものをマクロファージが貪食したのだと言えた。そのため、貪食されたものがいくつかということにはわからなかったが、不思議なことに貪食されていないビーズは不規則な大きさ（ナノサイズの蛍光をしめすものから凝集し様々な大きさを形成しているものまで）をしていたが、貪食されたビーズは一様に同一の大きさを持っていることがわかった。これはある大きさに凝集したビーズだけをマクロファージが貪食したのか、それともナノビーズを貪食した後マクロファージがある大きさに凝集させたのか？ 2つが

考えられた。また、ナノビーズにIgGを結合させる段階で、ナノビーズは超遠心でないと沈殿せず（10nmはそれでも完全ではなかった）、超遠心をするるとビーズ自体が大きな塊を形成してしまい単一粒子に戻すことが困難で、ナノビーズ単体にIgGが結合しているのか否かもわからないため、1 μ mカルボキシビーズでは6割ほどの貪食しか示さなかったのか、ナノサイズのビーズだと9割の貪食を示したことが、IgGの役割によるものなのか、ナノサイズ特有のものなのかということかわからなかった。今回はIgGをナノサイズの物質に結合させても貪食は示すということが言えた。



結論

実験の結果、抗体(IgG)が食細胞(マクロファージ)の貪食能を促進することがわかった。これより、将来的に有望されるナノ医療において、食細胞に直接治療を行うような効果的材料を開発する場合、

1 つの要素として抗体との結合性を持ち合わせる事が重要だと考えた。結合性を持つことで IgG により食細胞の貪食能が促進されるため、より効率的に効果が現れるようになるからと考えた。例えば、本実験のように表面にカルホキシル基のみを持つ材料や他の結合方法に適した表面状態を持つ材料などが考えられる。しかし、ナノサイズ材料になるとその物性は特異的に変化する場合が多く、ナノビースと IgG との結合でもあったように結合させる実験段階にも様々な問題が生じた。このように食細胞に有効なナノ材

料には抗体との結合性が不可欠か、その実現にはナノ特有の様々な問題を解決しなくてはならないという課題があることがわかった。

研究発表

学会発表

1 高木直, 樋口秀男 「白血球細胞マクロファージによるナノ粒子の貪食」

ナノ学会 5月 神戸

2 高木直, 樋口秀男 「白血球細胞マクロファージによるナノ粒子の貪食」

日本生物物理学会 9月 新潟

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用
新規シリカコーティング蛍光ビーズおよびX線造影剤開発に関する研究
（分担）研究者 小林 芳男 東北大学工学系研究科 助教授

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、AgI、蛍光ビーズを用いたシリカコーティングビーズ作製に成功した。現在粒径等、最適な物性を得るための検討を行っている。

A 研究目的

本研究は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。具体的には、安全なセンシングナノカプセルを創造し、医療応用するべく、センシングマテリアルをシリカコーティングし、安定なナノカプセルとする研究である。

B 研究方法

以下の2つの素材についてシリカコーティングを行い、TEMによる観察を行った。

1 新規蛍光ビーズを用いたシリカコーティングビーズの作製 市販の蛍光ビーズをシリカコーティングし、小林正樹、武田らと共同で基礎的な蛍光特性、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う。

2 X線造影剤の開発 シリカコーティングAgI内包ビーズを作製し、武田らと共同でCTによるX線撮影、TEMによる粒径の計測を行う。

3 新規蛍光画像装置の試作 小林正樹と

共同で、作成した蛍光ナノビーズの蛍光特性を評価する。

倫理面への配慮

シリカコーティングビーズの作製はヒト、動物を用いるため倫理的問題は生しない。

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 昨年度決定した最適な蛍光波長、サイズ 具体的には径40nm、蛍光波長720nmおよび755nmの市販蛍光ビーズを用いて作製したシリカコーティングビーズを用いてセンチネルリンパ節計測を行った。その結果、シリカコーティングしたビーズは径50-60nm程度の直径となり、コーティングビーズもセンチネルリンパ節計測に利用できることか明らかになった。しかしコーティングによりサイズの増大が避けられないため、造影率の低下が認められた。この内容は平成16年度第104回日本外科学会総会で報告予定である。

2 X線造影剤の開発 AgI内包コーティ

ングビーズの作製を行った。現任、武田らと共同で動物モデルおよびX線撮影装置による有用性評価と最適なサイズ等の条件について検討を行っており、特許出願の準備を進めている。この内容についても平成16年度第104回日本外科学会総会で報告予定である。

3 新規蛍光画像装置の試作 小林正樹らと共同で昨年度試作した超高感度蛍光画像計測装置を用いてシリカコーティングビーズの蛍光特性評価を行った。その結果、シリカコーティングによって蛍光ビーズの蛍光寿命延長が生じることが明らかになった。この装置を用いて武田らと共同で動物をモデルとした新規蛍光センチネルリンパ節生検法の開発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シリカコーティング 今後、さらに最適なコーティングビーズの蛍光特性を探ると共に、可能であれば粕谷らから作製した、より蛍光効率の高い Gd/Se クラスタについてもコーティング実験を行い、有用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る。

2 X線造影剤の開発 武田らと共同で、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） 超高感度蛍光画像計測装置を用いて新しい蛍光ナノビーズの蛍光特性の検討を継続する必要がある。

E 結論

以上の実験によりシリカコーティングナノサイズセンシングカプセルは新たな医療診断材料として利用可能であることがわかってきた。今後、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 健康危機情報

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

学会発表

1) 武田元博、小林芳男、中島護雄、多田 寛、亀井 尚、川添良幸、粕谷厚生、佐竹正延、大内憲明、新規ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いた X 線センチネルリンパ節生検の検討。第 104 回日本外科学会総会 平成 16 年 4 月 9 日

2) 中島護雄、武田元博、小林芳男、多田寛、亀井 尚、川添良幸、粕谷厚生、佐竹正延、大内憲明、蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節検索法の検討。第 104 回日本外科学会総会 平成 16 年 4 月 9 日

II 知的財産権の出願登録状況

なし