

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)

平成 16 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 17 (2005) 年 3 月

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

ナノテクノロジーを医療に応用すべく、新規センシングナノカプセル創製による新たな診断治療薬の開発を目指して、以下の研究を行った。

1. 金属内包シリコンフラーレンの理論設計と CdSe ナノ粒子原子構造の決定
 - ①. 金属内包シリコンフラーレンを理論設計し、CdSe ナノ粒子の原子構造を決定した (Nature Mat, 2004)。
 - ②. 微小なエネルギー差を持つ複数量子状態が存在する場合の基底状態を決定した (J Phys Chem, 2004)。
 - ③. 遷移金属原子とポルフィリンの組合せによりナノスケールの発光波長を変えることを可能とした (Molecular Simulation 2004)。
 2. AgI、蛍光ビーズ、量子ドットのナノサイズシリカコーティングビーズならびに磁性ビーズの作製に成功し、蛍光ビーズに関して安全性の確認を行った。AgI ビーズは造影剤として利用可能であることがわかり、特許申請を行った（特願 2005-42634 号）。
 3. ナノ医療を可能にする発光性標識材としての半導体量子ドット
 - ①. 表面処理法の開発により発光効率、寿命、安全性を向上させることに成功した（第 12 回微粒子と無機クラスター国際シンポ、2004）。
 - ②. 安全なナノ医療へ向けて、表面を閉じた 1 nmCdSe を作製し (Nature Mat, 2004)、Si 系量子ドットを合成した (特許公開 2004-210549)。
 - ③. 長耐久化を図るため表面が酸化しても自動的に自己修復する超耐久性量子ドットの試作に成功した。
 4. CdSe ナノ粒子による HER2 発現乳がん細胞の蛍光イメージング
 - ①. 量子ドットを用いた細胞内単分子イメージングに成功した (特許申請中)。
 - ②. 優れた蛍光特性を持つ CdSe ナノ粒子による HER2 発現乳がん細胞の蛍光イメージングに成功した。
 - ③. 高速 3 次元ナノ顕微鏡の開発により、リアルタイムに in vivo で、がん細胞に集積した蛍光像を体外からリアルタイムに観察することに成功した。
 5. 蛍光ナノ粒子を用いた新たながん画像診断法の開発
 - ①. 蛍光ナノ粒子によるがんセンチネルリンパ節生検法を開発した (Cancer Sci, 2005、特許公開 2004-269439)。また高感度蛍光画像計測装置を用い、癌の生体極微弱発光計測に成功した (Cancer Sci, 2004)。
 - ②. 生体安全性確保のため、シリカ (Si) コーティングナノビーズ作成に成功した (Physicochem. Eng. Aspects, 2004)。
 - ③. 非アレルギー性造影剤として Si-AgI ナノビーズ作成に成功した (Colloids and Surfaces A, 2004、特許申請中)。
- これらの成果はナノレベルで生体内の特異的な高感度蛍光計測が可能であることを示し、今後、がんの細胞レベルでの診断や、薬物動態の研究などへの応用が期待される。

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

(東北大学病院、講師), 樋口秀男(東北大学大学院工学研究科、助教授), 小林芳男(東北大学大学院工学研究科、助教授)

A 研究目的

フラーレン様構造を持つネットワーク物質は、強固かつ特異な構造から、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フラーレン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。しかしこれらは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。本研究は特にシリコンフラーレン・ネットワークおよび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安全な医療検査薬として活用し、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。

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ーレンネットワーク等分子設計グループ(川添、水関ら)、フラー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、小林芳男ら)、応用法研究グループ(武田、佐竹、小林正樹、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った。

1. 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) : 第一原理計算に基づく全電子

混合基底法と拡散量子モンテカルロ法を開発し、これらを用いた分子設計により、新たに有用な分子構造の薬品を設計、物理的性質を予測する。

2. X線造影剤の開発(粕谷、小林芳男、武田、石田ら) : ヨードを内包するセンシングナノカプセルを作製し、X線透過性、ラット、ウサギ等を用い、センチネルリンパ節造影と血管造影実験を行い、有用性を実証する。

3. センシングナノカプセルの開発(粕谷、小林芳男ら) : ナノサイズCd/Se蛍光ビーズを試験的に作製する。また市販の蛍光ビーズ、量子ドットをシリカやCd(OH)₂でコーティングし、蛍光特性や安定性の向上を図り、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。

4. 蛍光画像計測装置の評価、応用(小林正樹、武田、石田ら) : 生体極微弱発光計測技術を応用し、臨床試験を模した動物実験を行うべく移動型高感度蛍光計測装置の試作を行う。鏡視下蛍光観察装置を用いてウサギ、ブタ等中・大型動物のセンチネルリンパ節生検を行なう。深部にあるリンパ節を検出することで、蛍光センチネル検出法の応用をより具体的に検討することが目的である。

5. ナノサイズセンシングカプセルの新たな応用法ならびに生体分子標的検査試薬の開発(樋口、佐竹ら) : HER2発現ヒト乳癌培養細胞KPL-4及びKPL-4移植マウス乳癌モデルの癌組織を用い、HER2蛋白に

対するモノクローナル抗体をCdSeナノクリスタルで標識して腫瘍のin vivoイメージングを行う。

細胞の貪食を活性化させるため、CdSe粒子に抗体を架橋させた試料を作製した。次いでこの結合物が免疫細胞に貪食される様子を観察する。なお、当初の計画には入っていなかったが、細胞内の単分子イメージングをリアルタイムに行なうため、現在よりさらに時間応答性の高い受光素子が必要となり、EM-CCDを2台購入し、細胞内に取り込んだ量子ドットのリアルタイム計測に用いた。

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. 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) : 全電子混合基底法と拡散量子モンテカルロ法を開発した。これによりナノサイズ物質の原子構造決定と微妙なエネルギー差を持つ複数量子状態の基底状態確定が可能となった。また、生体構成要素として重要なポルフィリンの組合せにより、ナノスケールの発光波長を可変にした結果、種々の遷移金属原子の組合せと結合するポルフィリンの分子数により発光波長を大幅に変えることができ

た (Mol Simul, 2004)。

2. X線造影剤の開発 (粕谷、小林芳男、武田、石田ら) : まずヨード内包コーティングビーズの作製を行った。ヨード内包ビーズとしてAgIを用い、シリカコーティングビーズの作製に成功した。X線CT検査では造影剤として、従来の造影剤に匹敵するCT値を示す濃度を得ることができた (Colloids Surf A, 2004)。ラット・ウサギ等、小中型動物を用い、X線CT撮影装置により、造影剤として利用可能であることを示した。さらに評価を重ね、最適なサイズに関して検討を行い、新規X線造影剤シリカコーティングAgIナノビーズとして特許出願を行った (特願2005-42634号)。

3. センシングナノカプセルの開発 (粕谷、小林芳男ら)

1) 高発光効率寿命量子ドットの開拓
量子ドットの発光効率、水溶液中での耐久性、人体への安全性を高めるためにはドットの適切な表面処理が重要である。粕谷らは、量子ドットCdSe表面を酸化に強いCd(OH)₂で覆い、毒性の低いシリカでコーティングすることで物理的、化学的に安定化させることに成功した。有機性発光色素・ローダミンと比較して同等の発光効率、遥かに長期の耐久性と人体への安全性が期待される。

2) 径1nm CdSe及びSi系量子ドット合成
真にナノサイズで医療を精密に行うには1nm程度の量子ドットが必要であり、表面が閉じた構造の量子ドットを作製する必要がある。我々はCdSe量子ドットが決

められた数でのみ籠状で安定に存在することを見出し、 $(\text{CdSe})_{33}$ と $(\text{CdSe})_{34}$ を逆ミセル法での大量合成に成功した(Nature Mat, 2004)。シリコン系についても Si_{14} ドットを作製した(特許申請済)。

3) 自己安定型超耐久性量子ドット作製
微小量子ドットの長耐久化を図るため、表面が酸化しても逆反応誘起による自己修復型の新規超耐久性量子ドットの試作に成功した。

4. 蛍光画像計測装置の評価、応用(小林、武田、石田ら) : 試作した移動型高感度蛍光画像計測装置ならびに鏡視下蛍光観察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行なった。量子ドットを用いて従来からのパテントブルーを用いた色素法との比較を行い、蛍光検出法が体外から検出できること、色素法が対外から検出できないこと、なおかつ検出率において蛍光検出法が優れていることを明らかにした。また、シリカコーティングビーズによるセンチネルリンパ節の造影に成功した。しかしコーティング前のビーズに比べて造影率が低下した。コーティングによる粒径の増大が原因と考えられる。鏡視下蛍光観察装置を用いたセンチネルリンパ節生検モデルとして、現在のところブタをモデルとして乳腺センチネルリンパ節生検に対して行なった。従来の鏡視下手術装置のCCDに比べ、高感度な受光素子が必要であることがわかり、装置改良を進めている。

5. ナノサイズ・センシングカプセルの新

たな応用法ならびに生体分子標的検査試薬の開発(樋口、佐竹ら) : 量子ドットを用いた細胞内単分子イメージングに成功したタンパク質や受容体の動態解析に向けて研究を進めているが、PEGコーティングQDを抗HER2抗体で標識した複合体を作製し、ヒト乳癌培養細胞株KPL-4移植マウス尾静脈より投与、in vivoイメージング観察した。また高速3次元ナノ顕微鏡を開発し、CdSeナノクラスターでラベルした抗HER2抗体であるハーセプチンを用い、担癌マウスを用いて、ナノ粒子に対する細胞の食食を活性化させるため、 $\sim 10\text{nm}$ のCdSe粒子に抗体を架橋させた試料を作製した。抗体は細胞表面と結合性を持っているため、抗体と結合した物質は食食されやすくなる。これらのナノ粒子を分化させたマクロファージ中に入れ、24時間インキュベートして蛍光顕微鏡で観察し、食食されたナノ粒子の鮮明な像を長時間測定できた。また食食の瞬間を捉えるため、抗体を架橋させたナノ粒子を大きなビーズに結合させ、それをレーザーでトラップし細胞に接着させ10分から30分の連続観察を行い、マクロファージが食食する瞬間を観察することに成功した。新たなシステムの時間分解能は30msである(EMBO J, 2004)。さらに癌組織に集積した蛍光像を体外から描出、生体内で同複合体が腫瘍細胞に結合する様子をリアルタイムに観察することに成功した。

D 考察

本研究の目的はナノサイズ・センシングカプセルの分子設計と作製、および動

物モデルを用いた医療応用の検討である。本研究はこれらの目標を概ね達成できたと考える。作製したナノカプセルの医療への応用は今後の課題である。実際、患者に投与するためにはOECDの毒性評価基準のみならず、長期毒性や生殖安全性までの確認が必須であり、現在さらなる安全性の確認を行なっている。以下、個々の項目について考察した。

1. スーパーコンピューターを用いたフラーレン様ネットワーク物質の分子設計（川添、水関ら）：スーパーコンピューターを用いた全電子混合基底法と拡散量子モンテカルロ法などの新しいシミュレーション技術によって、従来存在し得ないと考えられてきたフラーレンネットワークを用いた物質を設計・作製し、シミュレーションの正確性を実証しつつ医療に応用していきたい。金属内包シリコンフラーレンについては蛍光特性も計算で予測でき、センシングナノカプセルとして有力な候補である。また、すでに構造の明らかな物質についても、これまで明らかにされていない物性をシミュレーションによって知ることが可能になったことは、今後の医療応用に大きな可能性を示したと言える。

2. X線造影剤の開発（粕谷、小林芳男、武田、石田ら）：シリカコーティングビーズAgIナノビーズが造影剤として有用であることが示されたが、今後さらにAgIの粒径を小さくし、シリカコーティングを薄くすることによって単位容積あたりのヨードの密度を上げ、X線造影効果を向上させる必要がある。引き続き最適な粒径、濃度、分散条件を求め、それらのX

線撮影装置ならびにTEMによる評価と分散性の向上、体内動態や安全性の確保等臨床応用に向けた研究を行いたい。

3. ナノサイズ・センシングカプセルの開発（粕谷、小林芳男ら）：Gd/Seのコーティングや修飾は安全性や蛍光特性の向上に欠かすことのできない技術である。今後、体内排泄経路も含め、コーティング技術はナノのテクノロジーの行く末を決める重要な技術であり、今回いくつかの重要な要素技術ができた意義は臨床応用に向けた研究を進める上で大きな意義を持つ。今後随時動物実験を行い、これらの有効性を検証して行きたい。シリコンは人体への影響も少なく微粒子にすると可視光領域で発光することから、標識粒子として極めて有望である。量子ドット同様の応用が期待できる。

4. 蛍光画像計測装置の評価、応用（小林正、武田、石田ら）：高感度蛍光画像計測装置により動物をモデルとして検出試験を行っているが、人における体表からのセンチネルリンパ節検出にはさらに深い組織からの蛍光検出が必要である。現在あらたに光・超音波共同作用による、より深部方向の対象を計測する技術の開発を進めている。

また今回試作した、移動型高感度蛍光計測装置ならびに鏡視下蛍光観察装置についてはより高感度な受光素子を取り付ける必要がある。

5. 生体分子標的検査試薬の開発およびナノサイズ・センシングカプセルの新たな応用法開発（樋口、佐竹ら）：半導体ナノクラスターであるCdSeを用いたナノクリスタルは、従来の蛍光色素に比べ、1)

極めて励起効率が高い（従来の蛍光色素の20-30倍）、2)材料が無機物なので有機系蛍光色素に比べ蛍光寿命が極めて長く、繰り返し励起光照射に耐え得る、3)粒径を変えることで蛍光波長が可変、などの優れた特徴があり、将来的に高感度計測が必要な生体内での応用が期待されている。量子ドットを用いた分子標的イメージング法は癌診断のブレイクスルーになるとともに、分子標的治療の効果判定や、腫瘍の局在診断などに応用が期待される。今回の研究で腫瘍細胞内の蛍光ナノ粒子単粒子を立体的、リアルタイム計測に計測することに成功し、さらに量子ドットを用いたPDT予備実験に成功した。今後は細胞内タンパクをマーキング、単分子計測を行い、タンパクの細胞内動態等、新規の応用法・計測法の検討を行う予定である。今後、癌の細胞レベルでの診断や転移診断、薬物とQDを結合させた薬物搬送(DDS)の研究などへの応用が期待される。また、使用可能なモノクローナル抗体の種類をさらに増やして行きたい。

E 結論

本研究の結果、ナノレベルで生体内の特異的な高感度蛍光計測が可能であることが明らかになった。われわれの開発した手法は今後、癌の細胞レベルでの診断や、薬物動態の研究などへの応用が期待される。ナノ物質の生体に対する安全性の確保はナノメディシンを円滑に実現する上で最も重要であり、慎重かつ的確に行なわなければならない。

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) Nakajima M, Takeda M, Ohuchi N, et al. Nano-sized fluorescent particle as a new tracer for sentinel node detection: An experimental model for decision of appropriate size and wavelength. *Cancer Sci*, 2005 (in press)

2) Zhou X, Kobayashi Y, Ohuchi N, Takeda M and Kasuya A, Strong Luminescence of CdSe Nanoparticles by Surface Modification with Cadmium (II) Hydrous Oxide. *International Journal of Modern Physics B*, 2005 (in press)

3) Zhou X, Kobayashi Y, Romanyuk V, Ohuchi N, Takeda M, Tsunekawa S and Kasuya A, Preparation of silica encapsulated CdSe quantum dots in aqueous solution with the improved optical properties. *Applied Surface Science*, 242, 281-286, 2005

4) Takeda M, Kobayashi Y, Ohuchi N, et al. Biophoton detection as a novel technique for cancer imaging. *Cancer Sci.* 95, 656-661, Aug 2004

5) Kobayashi Y, Takeda M, Ohuchi N, et al. Silica-coating of AgI semiconductor nanoparticles. *Colloids and Surfaces A:*

Physicochemical and Engineering Aspects,
251, 197-201, 2004

6) Kawahara M, Sakayori M, Ohuchi N, et al. Identification and evaluation of 55 genetic variations in the BRCA1 and BRCA2 genes of patients from 50 Japanese breast cancer families. *J. Hum. Genet.* 49: 391-395, 2004

7) Kobayashi Y, Misawa K, Ohuchi N, et al. Silica-coating of fluorescent polystyrene microspheres by a seeded polymerization technique and their photo-bleaching property. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 242, 47-52, 2004

7) 武田元博、粕谷厚生、川添良幸、大内憲明。ナノセンシングカプセルの医療応用と未来展望、*Bio Clinica*, 20 (1): 37-40, 2005

9) 武田元博、大内憲明、MRI による乳癌診断および臨床利用、別冊。医学の歩み 乳腺疾患 state of arts、伊藤良則・戸井雅和(編)、医歯薬出版、pp. 99-101、2004 年

2. 学会発表

(国際会議)

- 1) 1) Kasuya A, Takeda M, Ohuchi N, et al. Application of nanoparticles for optical fluorescence probe and X-ray CT in biomedicine. The 5th Internal Symposium on Nano-science and Technology for Medical Application. Sendai, February 2005.
- 2) Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N, et al. Frontier of nano-biology and nano-medicine. The 5th Internal Symposium on Nano-science and Technology for Medical Application. Sendai, February 2005.
- 3) Nakajima M, Takeda M, Ohuchi N, et al. Nano-sized fluorescent particles as new tracers for sentinel node detection: an experimental model for determination of appropriate size and wavelength. The 5th Internal Symposium on Nano-science and Technology for Medical Application. Sendai, February 2005.
- 4) Tada H, Higuchi H, Ohuchi N, et al. In vivo breast cancer cell imaging with semiconductor quantum dots conjugated with monoclonal anti-Her2 antibody. The 5th Internal Symposium on Nano-science and Technology for Medical Application. Sendai, February 2005.
- 5) Li S, Nakazato M, Yoshida N, Ohuchi N, et al. An effort to investigate the functional difference of transcription factor Renx1 isoforms derived from two distinct promoters. The 5th Internal symposium on Nano-science and Technology for Medical Application. Sendai, February 2005.

6) Takeda M, Kobayashi M, Ohuchi N, et al. Biophoton imaging for detection of cancer growth. The 5th Internal Symposium on Nano-science and Technology for Medical Application. Sendai, February 2005.

7) Ohuchi N, Tada H, Higuchi H, et al. Generation of CdSe nanocrystal semiconductor quantum dots conjugated with anti-HER2 antibody for molecular imaging of breast cancer. The AACR Special Conference 2005: Oncogenomics, San Diego, CA, 2005

(国内会議)

1) 武田元博、小林芳男、大内憲明、他。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、2004 年 4 月、大阪

2) 中島護雄、武田元博、大内憲明、他。蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検法の検討。第104回日本外科学会学術総会、2004年月、大阪

3) 武田元博、石田孝宣、大内憲明、他。乳癌治療におけるEBM。第29回日本外科系連合学会学術集会、2004年7月、東京

4) 中島護雄、武田元博、大内憲明、他。蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検法の検討。蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検法の検討。第14回乳癌基礎

研究会、2004年8月、筑波

5) 武田元博、小林芳男、他。AgIナノビーズを用いた新規X線造影剤の基礎的検討。第63回日本癌学会学術総会、2004年9月、福岡

6) 中島護雄、武田元博、大内憲明、他。ナノサイズシリカコーティング蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節診断法の検討。第63回日本癌学会学術総会、2004年9月、福岡

II. 知的財産権の出願登録状況

(国内特許)

①. 発明の名称：多重粒子及びその製造方法

登録日：平成 15 年 12 月 26 日

登録番号：2004 - 210549

②. 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

登録日：平成 16 年 03 月 08 日

登録番号：2004 - 269439

③. 発明の名称：X線造影剤及び造影方法

出願日：平成 17 年 02 月 18 日

出願番号：特願 2005-042634

(国外特許)

④. 発明の名称：多重粒子及びその製造方法

登録日：平成 15 年 12 月 26 日

登録番号：PC-9040

⑤. 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

登録日：平成 16 年 03 月 08 日

登録番号：PC-9113

II. 分担研究報告

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用
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およびX線造影剤開発
に関する研究

（分担）研究者 武田 元博 東北大学病院

（分担）研究者 石田 孝宣 東北大学病院

（分担）研究者 佐竹 正延 東北大学加齢医学研究所

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、前年度決定した、蛍光検出法によるセンチネルリンパ節生検における最適な粒径・蛍光波長に基き、シリカコーティングナノサイズセンシングカプセルおよび量子ドットの有用性を検討した。量子ドットは従来のポリスチレン蛍光ビーズに比べて高い検出率を示すことが明らかになった。さらに、量子ドットを用いた蛍光計測法が従来行われてきた色素法に比べて高い検出率を示すことも明らかにした。ウサギやブタを用い、体表や内視鏡を用いた検出法についても行なった。安全性評価において、従来の蛍光ポリスチレンビーズがセンチネルリンパ節検出に用いる限り、ラットに急性毒性を示さないことも明らかにした。さらにAgIナノビーズについてX線造影剤として有用であることもわかった。蛍光ビーズ・AgIナノビーズを用いたシリカ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継続して行った。

A 研究目的

本研究はナノサイズのフラーレン・シリコンフラーレン等ネットワーク物質、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安全な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。本年度、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、すでに決定した最適波長・サイズに基づき、シリカコーティングナノサイズ蛍光ビーズおよび量子ドットについてセンチ

ネルリンパ節検出の検討を行なった。さらにシリカコーティング AgI ナノカプセルのX線造影剤としての有用性をCT撮像によって検討した。

B 研究方法

研究方法=センシングナノカプセルをX線造影剤や蛍光法やX線法による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. 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、CTによるX線撮影、TEMによる粒径・分散の計測をおこない、実用

化に向けた検討を継続して行う。

2. 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、基礎的な動物実験モデルによる有用性の確認を行なう。さらに大型動物をモデルとした検討を開始し、臨床への応用を目指す。蛍光ナノビーズに関しては安全性試験も行なう。

3. 鏡視下手術用蛍光画像装置の改良：分担研究者である小林正樹と共同で、昨年度試作し、動物をモデルとした蛍光計測に必要な試作機の改良を行い、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および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：昨年度決定した最適な蛍光波長、サイズ、すなわち直径；40nm、蛍光波長；近赤域がセンチネルリンパ節生検に相当であることが明らかになった。

蛍光波長720 nmおよび755nm、さらに800nmの市販蛍光ビーズをもとに粕谷、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用いてセンチネルリンパ節計測を行った。その結果、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

ることが明らかになった。しかしコーティングによりサイズの増大が避けられず、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した。

安全性に関して、OECDの基準に基づき、ラットに対し皮下注射を行なったが2週間の期間で急性・亜急性毒性は認められなかった。

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（ナノサイズシリカコーティングAgIビーズ）の作製を行った。現在、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、この内容については平成16年度第104回日本外科学会総会および癌学会総会で報告した。また特許出願を行なった。

3. 新規蛍光画像装置の試作（小林正樹、武田ら）：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。

さらに高感度な計測を行なうために微弱光計測用レンズを購入し、この装置を用いて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昨年に引き続き行なった。蛍光計測法によるセンチネルリンパ節生検法を特許公開した（センチネルリンパ節検出剤及びその検出方法、登録番号2004 - 269439）。また昨年試作した移動型高感度蛍光計測装置、および鏡視下蛍光観察装置を動物実験（ウサギ、ブタ）に供し、ウサギ体表から生体内投与の蛍光色素を蛍

光観察することができた。鏡視下手術装置についても検討を行ったが通常の鏡視下手術装置の受光素子では感度が足りないことがわかっており、現在高感度受光素子を組み込む装置の改良を行っている。

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が作製した、より蛍光効率の高い Cd/Se 蛍光ビーズについても動物実験を行い、体内動態を含む有用性・安全性の検討を行う必要がある。センチネルリンパ節生検においては、蛍光ナノビーズのほとんどすべてが腫瘍周囲と腋窩リンパ節に留まり、全身には拡がらないと考えてよいが、静注して用いる際は排泄経路が問題となる。したがって排泄経路の修飾や安全性確保のためにコーティング材料、厚さなど最適なコーティング・表面修飾技術を今後も改良する必要があり、随時動物実験を行い、得られたビーズの有用性、安全性を検証して行きたい。

2. X線造影剤の開発：ウサギを用いたCT動物実験では撮影に成功した。今後さらに有効性、安全性および排泄経路の検討を行う予定である。また排泄が悪い場合、表面の化学的修飾による排泄経路の確保も視野に入れ、検討を進めている。

3. 新規蛍光画像装置の試作（小林、武田ら）：現在の技術では深部方向1cm程度が限界であり、やせた人には利用できるが、多くの人に対して蛍光センチネルリンパ節生検を行うためには生体極微弱発光計

測技術を応用した新規超高感度蛍光画像計測装置を用い、光-超音波相互作用など、より深部方向の対象を計測する技術の開発が必要である。現在基礎的実験を始め、良好な結果を得ている。また、移動型装置や鏡視下観察装置を用い、大型動物の計測に着手し、乳腺外科のみならず、肺、食道など胸腔ならびに消化器など腹腔等、応用範囲を拡大しつつあるが、鏡視下手術におけるセンチネルリンパ節検出法では従来の装置についている受光素子では感度不足であることがわかっており、高感度な受光素子を組み込む改良を行っている。

E 結論

以上の実験により、蛍光、および AgI ナノサイズ・センシングカプセルを用いたセンチネルリンパ節生検法は癌のテーラーメイドメディスンを推進する新たな医療診断技術として、ナノサイズ AgI ビーズは新たな X 線造影剤として用いたますます有用となることが予測される。しかし血中に投与した際の体内動態は不明であり、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を行なう予定である。

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) Nakajima M, Takeda M, Kobayashi M,

- Suzuki S, Ohuchi N, Nano-sized fluorescent particle as a new tracer for sentinel node detection: An experimental model for decision of appropriate size and wavelength. *Cancer Sci.*, 96, 2005 (in press)
- 2) Zhou X, Kobayashi Y, Ohuchi N, Takeda M and Kasuya A, Strong Luminescence of CdSe Nanoparticles by Surface Modification with Cadmium (II) Hydroxide. *International Journal of Modern Physics B*, 2005 (in press)
- 3) Zhou X, Kobayashi Y, Romanyuk V, Ohuchi N, Takeda M, Tsunekawa S and Kasuya A, Preparation of silica encapsulated CdSe quantum dots in aqueous solution with the improved optical properties. *Applied Surface Science*, 242, 281-286, 2005
- 4) Takeda M, Kobayashi Y, Takayama M, Suzuki S, Ishida T, Ohnuki K, Moriya T and Ohuchi N, Biophoton detection as a novel technique for cancer imaging. *Cancer Sci.* 95, 656-661, Aug 2004
- 5) Kobayashi Y, Misawa K, Takeda M, Kobayashi M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, Kasuya A and Konno M, Silica-coating of AgI semiconductor nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 251, 197-201, 2004
- 6) Kawahara M, Sakayori M, Shiraishi K, Nomizu T, Takeda M, Abe R, Ohuchi N, Takenoshita S, Ishioka C. Identification and evaluation of 55 genetic variations in the BRCA1 and BRCA2 genes of patients from 50 Japanese breast cancer families. *J. Hum. Genet.* 49: 391-395, 2004
- 7) Kobayashi Y, Misawa K, Kobayashi M, Takeda M, Konno M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, Kasuya A, Silica-coating of fluorescent polystyrene microspheres by a seeded polymerization technique and their photo-bleaching property. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 242, 47-52, 2004
- 8) 武田元博、粕谷厚生、川添良幸、大内憲明、ナノセンシングカプセルの医療応用と未来展望、*BIO Clinica*、Dec 2004
- 9) 武田元博、大内憲明、MRI による乳癌診断および臨床利用、別冊。医学の歩み 乳腺疾患 state of arts、伊藤良則・戸井雅和(編)、医歯薬出版、99-101、2004年6月
2. 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、2004 年 4 月 9 日、大阪
- 2) 中島護雄、武田元博、多田寛、亀井尚、小林正樹、鈴木聡、川添良幸、粕谷厚生、

小林芳男、三澤清登、大内憲明、蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検法の検討。第104回日本外科学会学術総会、2004年4月8日、大阪

3) 武田元博、石田孝宣、大貫幸二、鈴木明彦、中島護雄、多田 寛、渡辺 剛、桜井遊、伊藤正裕、原田成美、大内憲明、乳癌治療におけるEBM。第29回日本外科系連合学会学術集会、2004年7月3日、東京

4) 中島護雄、武田元博、小林正樹、鈴木聡、小林芳男、三澤清登、大内憲明、蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検法の検討。蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検法の検討。第14回乳癌基礎研究会、2004年8月29日、筑波

5) 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、AgIナノビーズを用いた新規X線造影剤の基礎的検討。第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日-10月1日、福岡

6) 中島護雄、武田元博、多田寛、小林正樹、鈴木聡、小林芳男、三澤清登、川添良幸、粕谷厚生、大内憲明、ナノサイズシリカコ

ーティング蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節診断法の検討。第63回日本癌学会学術総会、2004年9月30日、福岡)

7) 武田元博、石田孝宣、大貫幸二、鈴木明彦、中島護雄、多田 寛、渡辺 剛、桜井遊、伊藤正裕、原田成美、原田雄功、大内憲明、Lateral Tissue Flap を用いた乳房温存および一期的乳房再建手術。第12回日本乳癌学会総会、2004年6月11-12日、小倉

8) 武田元博、石田孝宣、大貫幸二、鈴木明彦、中島護雄、多田 寛、渡辺 剛、桜井遊、伊藤正裕、原田成美、大内憲明、乳癌治療におけるEBM。第29回日本外科系連合学会学術集会、2004年7月3日、東京

II. 知的財産権の出願登録状況 研究代表者と同じ

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用

量子力学計算による医療用新物質探索と物性予測

（分担）研究者 川添 良幸 東北大学金属材料研究所

（分担）研究者 水関 博志 東北大学金属材料研究所

研究要旨

我々が用いているGW近似法は、標準理論である密度汎関数理論と局所密度近似に基づく第一原理計算法に電子交換相関相互作用を取り込むためのHedinによる電子ガス理論からの大きな寄与によって成り立っている。今回複数の金属内包ポルフィリンに対するGW近似計算を行い、それぞれ初めて一重項酸素生成能及び蛍光特性の可変性の予測に成功した。さらに籠状金クラスターについても構造シミュレーションを行い、初めて籠状にクラスターが成長しうることを示した。また前年に引き続き、金属内包シリコンフラーレンに対し、種々の内包原子種に関して安定な構造を探索した。

A 研究目的

本プロジェクトでは、がん部位の詳細決定のために必要とされるナノスケールの機能性粒子として、最初に市販されている数十ナノメートルサイズのCdSe微粒子を採用し、マウスを用いて実用性確認試行を行った。既に、従来のRIや有機色素に比べて30倍以上の発光強度とレーザー照射後、長寿命の発光時間を有し、体内での発光を外部から十分に測定できることを確認している。また、昨年度は、実験と理論の共同研究として、第一原理シミュレーション計算により、量子効果の著しいCdSeの1ナノメートルサイズの魔法数クラスター大量合成と形状及び物性予測に成功した。¹⁾ このクラスターは、従来からの炭素原子のみから構成されたフラーレンやカーボンナノチューブ、また単一元素系を安定化させるための1金属原子添加金属内包フラーレンとは全く異なり、2元合金クラスターとして最初のナノメートルサイズにおける安

定粒子であり、今後、周期律表中の各種組合せに対して幅広い探索がなされることが期待される。図1に原子構造を示す。2元合金の種類は3千もあり、成分や構造の自由度も考慮すれば、まさに無限の可能性が存在する。さらに、現在の標準理論である密度汎関数理論と局所密度近似に基づく第一原理計算法をはるかに越えたより高精度の量子力学計算法の定式化とその活用により、さらなる高機能性粒子の理論設計を試みた。

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。

2 GW近似法

本研究の基盤となっているシリコンクラスター及び金属内包シリコンフラレンに対するGW近似計算を行い、そのイオン化ポテンシャル及び電子親和力の絶対値算定に成功した。GW近似法は、標準理論である密度汎関数理論と局所密度近似に基づく第一原理計算法に電子交換相関相互作用を取り込むための $H_e d i n$ による電子ガス理論からの大きな寄与である。本研究では、従来行われていた擬ポテンシャル法と平面波展開による結晶のフロンティア電子状態計算の枠のレベルを超え、我々が独自に開発している全電子混合基底法により、複雑な構造体に対する全電子状態の絶対値算定を可能としたものである。通常的第一原理計算は基底状態を対象としているため、このような励起状態を含む物理量の絶対値算定は不可能である。

3 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及び金属内包シリコンフラレンに対して、内包原子種を大幅に増加し、系統的にその最安定原子構造と物性を算定した。2つの元素を組み合わせたナノスケールのクラスター全般に関しても数多くのシミュレーション計算を実行し、それらの最安定原子構造決定と物理化学的性質の算定を行った。その中でもバルク相としては、半導体産業で広く活用されているII-VI族合金の作るナノスケールのクラスターの最安定原子構造決定と物性算定を系統的に行った。

4 籠状金クラスター

金属内包シリコンフラレンと対照的な各種原子を内包する籠状の金クラスターに対する第一原理シミュレーション計算を実行した。この系は、最近、金クラスターが平面的な成長をするという従来の常識を破るシミュレーション計算結果が発表されたことを受け、その3次元形状として金原子の作る籠型ナノクラスターを検討したものである。

5 ポルフィリンクラスター

癌のキラーとして期待されるシングレッ

ト状態の酸素分子の電子状態等は、電子のスピンの依存する物性であり、その算定には極めて高精度の数値計算を行う必要がある。生体構成要素として重要なポルフィリンの組み合わせによって、ナノスケール物質の発光波長を可変にする方策ならびにシングレット状態の酸素分子を励起するために必要な発光が得られるか否かを理論的に検討した。

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

今回の成果が、始めてシリコンクラスター及び金属内包シリコンフラーレンに対して、イオン化ポテンシャル及び電子親和力の絶対値算定に成功したものである。これらの値から、表1に示すHOMO-LUMO (Highest Occupied Molecular Orbital - Lowest Unoccupied Molecular Orbital) ギャップが求まるため、対象とするクラスターの発光色が理論的に確定または予言できた。表1を見れば明らかに、通常なされている局所密度近似(LDA)やハートレーフォック近似(HFA)は正しい算定を与えず、理論的根拠の薄いハイブリッドモデル(単にLDAとHFAに対する操作)がそれなりの値を出すのみである。

1 シリコンクラスター

内包原子種によっては、これまでに知られていた12量体より少数のシリコン原子で安定構造を実現できるものも発見された。特に、皿上のクラスターは、半内

包原子種によって外部環境に全く異なる反応性を示すため、動的新奇性が実現できる可能性を秘めていることが判明した。II-VI族合金の作るナノスケールのクラスターの最安定原子構造決定と物性算定を系統的に行った結果、従来のバルク物質への原子ドーピングによる機能性発現法では実現不可能な新奇な物性が多数見つかった。

2 籠状金クラスター

金属内包シリコンフラーレンと対照的な各種原子を内包する籠状の金クラスターに対する第一原理シミュレーション計算を実行した。

3 ポルフィリンクラスター

種々の遷移金属原子の組み合わせと結合するポルフィリンの分子数により発光波長を大幅に変えることが可能であることを確認した。

D 考察

現在、単元素シリコンクラスターに対しては、実験結果があり、本シミュレーション結果と良い一致を示している。また、金属内包シリコンフラーレンに対しては、質量スペクトルに特異的なピークが見られ、魔法数クラスターであることが確認され、今後の大量合成と単離、物性測定が望まれている状況である。

1 シリコンクラスター

従来の平面波と擬ポテンシャルの組み合わせによる局所密度近似計算または原子軌道の線形結合による分子軌道計算と比べ格段に高精度の2つの方法を開発し、具体的な対象物に適用している。すなわち、局所密度近似を超えて全電子を扱う

混合基底法と拡散量子モンテカルロ法である。これらの数値計算用プログラムを適用することにより、ナノスケール物質の原子構造の決定と微妙なエネルギー差を持つ複数量子状態が存在する場合の基底状態確定が可能となっている。具体的な計算としては、金属内包シリコンフラーレンに関する超大規模シミュレーション計算を実行した。この系に対する従来の第一原理計算結果は、適用するモデルによって魔法数クラスターが異なるなどの不具合があり、より高精度の計算が望まれていた。本計算手法により、この問題に対する抜本的な解決が得られたので、今後、実験以前に第一原理シミュレーション計算によって新金属内包シリコンフラーレンを予言することに関する基盤が確立されたと言える。

2 籠状金クラスター

最近、金クラスターが平面的な成長をするという従来の常識を破るシミュレーション計算結果が発表されたことを受け、その3次元形状として金原子の作る籠型ナノクラスターを検討したが、貴金属は生体反応が少なく、ナノ医療への応用可能性が高いため、この新クラスターの物性値算定を行い、発光性などを確認した。磁性を持つナノクラスターの探索も併せて行った。これらの新ナノ粒子は、体外から磁場を印加することによって大幅に物性を変化させることが出来るため、従来の放射性同位元素や有機色素の代替物質として生体に安全な新イメージング物質となる可能性が期待される。

3 ポルフィリンクラスター

種々の遷移金属原子の組み合わせと結

合するポルフィリンの分子数により発光波長を大幅に変えることが可能であることを確認した。本研究によって、種々の遷移金属原子の組み合わせと結合するポルフィリンの分子数により発光波長を大幅に変えることが可能であることを確認した。すなわち、遷移金属種類と2から10量体のポルフィリンの結合長により、その物性が大幅に変化し、それにより、発光波長が望まれる可視光領域全域をカバーすることが可能であることが示された。また、ポルフィリン分子を多数個平面的に結合する実験が成功したという報告がなされている。我々のシミュレーション計算結果とこの実験結果を活用し、生体に取り込んでも安全な高光度の発光物質の開発が期待される。この新物質を用いると、上述のシングレット状態の酸素分子を励起するために必要な発光が得られる可能性があり、従来法では実現が困難であった生体に安全で高機能な癌キラー実現に向けて極めて重要な知見である。

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て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、シリコンクラスター、金クラスター、ポルフィリンクラスターは有望な素材である。将来、

これらの有用物質が大量に合成され、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ことが予測される。

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

I 論文発表

1. Jain A, Kumar V, Kawazoe Y
All-electron calculations on MgO cluster ($n=1-10$) with Tohoku University Mixed-Basis Program TOMBO. *Trans. Mat. Res. Soc. Jap.*, 29, 15-18, 2004
2. Kawamura H, Kumar V, Kawazoe Y
Water adsorption on Ti-doped silicon clusters. *PHYSICAL REVIEW B*, 70 (24): Art. No. 245433 DEC 2004
3. Sawada T, Wu J, Kawazoe Y, Ohno K
Dynamics on Electronic Excitation in Chemical Reaction. *Trans. Mat. Res. Soc. Jap.*, 29[8], 3727-3729, 2004
4. Bae YC, Osanai H, Kumar V, Kawazoe Y, Nonicosahedral growth and magnetic behavior of rhodium clusters. *PHYSICAL REVIEW B* 70 (19): Art. No. 195413 NOV 2004
5. Wang SY, Yu JZ, Mizuseki H, Sun Q, Wang CY, Kawazoe Y, Energetics and local spin magnetic moment of single 3,4d impurities encapsulated in an icosahedral Au-12 cage. *PHYSICAL REVIEW B* 70 (16): Art. No. 165413 OCT 2004
6. Wang SY, Yu JZ, Mizuseki H, Yan JA, Kawazoe Y, Wang CY, First-principles study of the electronic structures of icosahedral Ti-N ($N=13, 19, 43, 55$) clusters. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS* 120 (18): 8463-8468 MAY 8 2004
7. Noguchi Y, Ohno K, Kumar V, Kawazoe Y, Barnakov Y, Kasuya A, Dielectric Function of (CdSe)₁₃ Clusters. *Trans. Mat. Res. Soc. Jap.*, 29[8], 3723-3725, 2004
8. Kumar V, Singh AK, Kawazoe Y, Smallest magic caged clusters of Si, Ge, Sn, and Pb by encapsulation of transition metal atom. *NANO LETTERS* 4 (4): 677-681 APR 2004
9. Y. Kikuchi, R. V. Belosludov, H. Baba, A. A. Farajian, H. Mizuseki, and Y. Kawazoe, Structure and Electronic Properties of Metal Di-(4-Thiophenyl)-Porphyrin. *Mol. Sim.*, 30, 929-933, 2004