

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

（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、薬剤を結合可能なナノセンシングカプセルを作製し、医療への応用を計画した。ネットワーク物質として直径数 nm の II-VI 族半導体ナノ粒子について、作製とコーティングによる無害化やカプセル化の方法を開拓して試料の評価を行った。またこのコーティング技術の一つとしてナノ粒子をコアシェル構造にし、発光効率を更に上げる工夫を行った。次に、無毒と予測されるシリコンについてもナノ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。これらの試料に対して、より高度なナノ医療の可能性を追求した。

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した。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取り上げた。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。また磁性体で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、無機半導体も有機物と同様に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、受容体等と結合させることや無害化を果たすことにより、新たなナノ医療への応用を可能にする。更に粒径をより小さくできれば、新たな応用の道も大きく開けてくる。これらの可能性についても追求した。

B 研究方法

以上の目的に対して本年度は、1. 直径数 nm の II-VI 族半導体微粒子或いは磁性粒子の作製とコーティングによるカプセル化、2. 毒性の低いシリコンナノ粒子の作製、の2つの課題を選択し、以下の研究方法を設定した。

1. 直径数 nm の II-VI 族半導体微粒子の作製とコーティングによるカプセル化

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発光ナノ粒子の設計と製作を逆ミセル法などの溶液法を用いて行い、ナノ医療用各種センサーとしての性能を評価する。

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。特に CdSe についてはナノ粒子にした際の発光波長が丁度バルクの赤外から可視部に移動して来ることからナノ医療には最適であり、詳しく取りあげて量子サイズ効果を明らかにする。

無機物は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、上記半導体は僅か2種類の元素でしかも一様な構造を持つ物質であるために、光照射によって全体が一様に励起されて発光する。従ってナノ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。一方有機色素は基本的には分子なので形状と大きさは一義的に決まっています。大きくも小さくも出来ない。発光波長を変えるには分子そのものの構造を変えるしか方法はない。

カプセル化については主にシリカによるコーティング技術を開発した。シリカは無害であり、可視光を透過するために、ナノ医療に適している。コーティングの原料として Tetraethylorthosilicate (TEOS) を用いた。又、安定剤としては Polyvinylpyrrolidone (PVP) などを添加した。

2. 毒性の低いシリコンナノ粒子の作製

シリコンは半導体材料であり、発光する特性を備えているが赤外域である。しかしナノメータサイズの粒子になれば、

量子サイズ効果によって可視から紫外に移動する可能性がある。元々直接遷移のエネルギーギャップは 3.6eV もあり、紫外域である。化学的にも安定で毒性が少ないことでも知られる。にもかかわらず、数 nm のシリコンナノ粒子の研究は見方によっては皆無に近い。例えばシリコンポリマーなどは有機化学の一分野を形成して研究が盛んであるが、ナノ粒子とは範疇を異にする。有機物の炭素をシリコンに置きかえた物質と位置づけられるが、置きかえられている箇所は骨格の部分のみであって成分比から見ると C-H が主であったりする。シリコンが主成分である粒子の作製は寧ろ固体試料のアーク放電、アルゴンスパッタリング、電気化学的エッチング等を用いる方法がある。ここでは電気化学的エッチング方法でナノ粒子の作製を試み、試料を得ることが出来た。

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. CdSe 微粒子の作製と Cd(OH)₂ シェルの修飾

0.30 ml、0.15 M の CdSO₄ に 5.62 ml の H₂O と 0.15 ml 2.0wt.% の Na-Citrate を加え、0.185 ml、0.2M の Na₂SeSO₃ を反応させて CdSe ナノ粒子を作製した。Na₂SeSO₃ (pH 8.03 → 7.85) は室温で 5 日間、窒素でバブリングして

合成した。0.2 M の Na₂SeSO₃ は 0.79g の Se と 3.15 g の Na₂SO₃ を 50ml の H₂O に入れて作った。得られた溶液を 450 rpm の遠心分離で処理して、黄色の CdSe ナノ粒子を合成した。

次に CdSe を Cd(OH)₂ でコーティングしたコアシェル型の CdSe@Cd(OH)₂ を作製した。方法は 3 ml の CdSe suspension に 0.24 ml 2.0% Na-Citrate と 39.5ml の H₂O を加えて超音波処理をした後、CdSO₄ と NaOH を加えた。

シリカコーティングは、3ml の上記分散液に 0.004ml、0.25M の SNTA と 15ml のエタノールを加え、さらに TEOS を加えて行った。

作製された CdSe 試料の表面を Cd(OH)₂ で修飾すると発光効率が 10 倍程度まで向上することがわかった。この結果からコーティング前の CdSe 表面に発光効率を下げる要因が取り除かれるためである。即ち光励起によって生じた電子と正孔の何れか又は両方が表面原子や不純物に捉えられ、両者の再結合を妨げる効果である。

もう一つ考えられる効果は CdSe と Cd(OH)₂ とのバンドギャップの違いである。後者の方が前者よりバンドギャップが大きく、CdS の中で励起された電子又は正孔が Cd(OH)₂ との界面で押し戻されることによる。

以上の二つの効果によって効率の良い発光が達成されると解釈された。効率はローダミンの 24% となった。

2. CdSe@Cd(OH)₂ のシリカコーティング

シリカコーティングについてはコアシェル型の CdSe@ (Cd(OH)₂)₂ になってもコーティング出来ることがわかり、発光効率の低下も殆ど認められない試料が得られた。コーティングも良好で、光腐食が抑えられている。

3. シリコンナノ粒子の作製

シリコンナノ粒子を電気化学エッチング法で作製した。シリコン結晶を電極とし、対極に白金を用いてエッチングした。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。

得られたナノ粒子として、発光波長が赤の600nm、橙色の500nm、黄色の400nm及び紫外の300nmで発光する4種類のサイズの異なる試料を作ることが出来た。

質量分析を行ったところ、2000程度のところにピークが見られた。全てが質量28のシリコンで出来ているとするとシリコンの数は70程度となり、直径も2nm以下になると考えられる。特に小さな粒子は発光効率がローダミンと遜色ない程度に高いことがわかった。

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」について、幾つかの新しいタイプのナノ粒子を作製、評価することが出来た。

1. CdSe ナノ粒子、コアシェル CdSe@ (Cd(OH)₂)₂ 粒子及びシリカコーティング CdSe 粒子についてシリカコーティング

が出来るようになり、ナノ医療にとって毒性の低減が可能になった。又コアシェル型にすることにより、発光効率も10倍程度高めることが出来た。センチネルリンパ節の位置検出の試料として準備した。

2. シリコンナノ粒子

シリコンナノ粒子についても、量子サイズ効果によって可視部から紫外まで幅広く発光波長の異なる試料を得ることが出来た。特に短波長で発光するシリコンナノ粒子は効率がローダミンに匹敵することもわかった。

E 結論

以上の通り、1. 直径数nmのII-VI族半導体微粒子或いは磁性粒子の作製とコーティングによるカプセル化、2. 毒性の低いシリコンナノ粒子の作製、の2つの課題を選択し、それぞれ、ナノ医療に適するナノ粒子の作製、特性の最適化、毒性の低減、籠型ネットワーク構造の創製、を実現した。

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

5) 論文発表

1. Kato Y, Yokobayashi H, Kasuya A, Kagawa M and Kawasaki M, Oxygen-Deficient Anatase Precipitated from High-Temperature Plasma. *J. Ceram*

Soc, 87 [1] 166-169, 2004

2. Kasuya A et al., Ultra-stable Nanoparticles of CdSe Revealed from Mass Spectrometry. *Nature Materials* 3 (2004) 99-102

3. 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)

4. 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

2. 学会発表

日本物理学会第 59 回年会、
安定な II-VI 族半導体ナノ粒子、 $(\text{CdSe})_{33}$
と $(\text{CdSe})_{34}$ の大量合成と構造解析
粕谷厚生 他

II. 知的財産権の出願登録状況
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
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

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と評価を行うとともに、高解像化のための音響光学効果を利用した新しい蛍光画像計測法について検討を行った。

A. 研究目的

皮下組織に集積、分布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検出するための蛍光画像計測・分析技術の研究開発を行う。最終年度は、各種蛍光ビーズおよび量子ドットを用い、生体組織の自家蛍光との効果的弁別方法について、2次元空間における分光スペクトル情報を取得するための分光イメージングシステムによる光画像計測と、ナノゲート高感度フォトンカウンティングカメラによる量子ドットの長蛍光寿命特性を利用した時間分解蛍光寿命イメージングの2つの観点から検討を行う。生体試料に蛍光体を包埋した生体擬似試料を用い、観測可能な深度や分析アルゴリズムに関する検討を行う。さらに、生体内部における蛍光分布の高解像計測のための、新規計測手法として音響光学効果を利用した生体深部にお

ける蛍光変調検出法について光学系の最適化や蛍光特性分析のための基礎検討を行う。これにより、本課題において目標としたナノセンシング・カプセルの医用応用に向けた計測プロトタイプ構築を図ることを目的とする。

B. 研究方法

① 蛍光分光イメージング法

分光画像計測システムは入射光学系、コリメーション光学系、反射型ブレード回折格子、出射光学系、冷却CCDからなりこれを一体のダークチャンバー内に配置した。試料にはレゾナントスキャナにより1次元走査されたライン状の励起光が照射される。反射型回折格子を分散素子として用い、分散方向に垂直な方向に高速1次元走査してレーザービームを試料に照射することにより、励起光ライン上での各点に対

応じた蛍光スペクトルを2次元画像としてCCDに結像する。さらに励起ビームを1次元走査方向に直交する方向に低速度走査しながら、それに同期して2次元画像を計測することにより全走査範囲上の各点における分光スペクトルを計測することができる。あらかじめ計測し、データベース化した試料各組織由来の自家蛍光スペクトルとパターン比較・分析することにより、ターゲットする量子ドット由来の蛍光成分を自家蛍光と分離して画像化する。

実験では食用豚ロース肉を用い、異なる厚さにスライス成形した肉の下に蛍光体を置いて計測を行った。蛍光体には直径1mm、長さ3mmのガラス管に封入した量子ドット（蛍光波長800nm）を用いた。ロース肉の自家蛍光の計測を行うとともに、組織の違いによる自家蛍光スペクトルパターンの違いを分析し、量子ドット由来の蛍光スペクトルパターンとのパターン分析、画像処理に関する検討を行った。

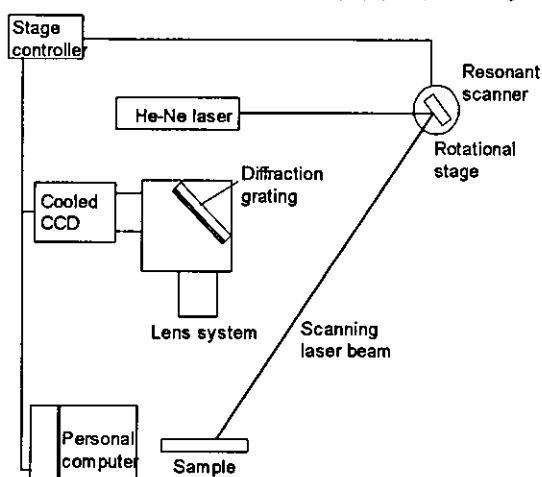


図1 蛍光分光イメージングシステム

② 蛍光寿命イメージング法

蛍光寿命イメージングシステムは、イ

メージインテンシファイア型ナノ秒ゲートドフォトンカウンティングカメラを用い、自家蛍光と量子ドットの蛍光寿命差を利用することにより画像化を図るものである。図2にブロック図を示すが、外部パルス発生器で発生させたパルス信号をトリガとし、励起用パルスレーザー（パルス幅400ps）、およびこれと同期し、あらかじめ設定した時間幅、時間範囲で遅延をかけたトリガ信号によりイメージインテンシファイア印加電圧を制御し、10ns~100nsの範囲で時間ゲートをかけた。最小ゲート幅は10nsであり、励起用パルスレーザーに同期して遅延時間をゲート時間分解能で変化させながら、ゲート内の光電子パルス数をカウントする。励起パルス周波数150kHzで繰り返し計測し2次元メモリー上に蓄積することにより、光子計数画像として蛍光寿命画像計測を行う。使用した量子ドットの蛍光寿命はおよそ100nsであり、自家蛍光の蛍光寿命の約10倍であることから、10~100ns時間分解能での蛍光寿命イメージングを行った。実験では、生体試料としてトリムネ肉を用いて評価実験を行った。トリムネ肉内部に深さを変えて量子ドットを包埋した試料を作製し、異なる深さでの画像計測を行った。

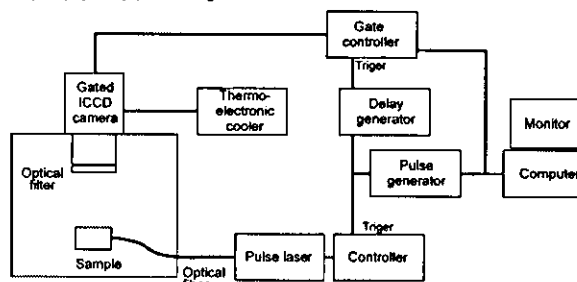


図2 蛍光寿命イメージングシステム

③音響光学効果を利用した蛍光イメージング法

生体内で発生した蛍光は多重散乱により、外部からその位置情報を検出することは困難である。本手法では蛍光源の位置を同定するため、散乱媒質内で発生した蛍光に局所的に超音波変調を加え、これを「目印」として散乱光中での蛍光源の位置情報を抽出するものである。集束音場を光散乱体内部に形成すると、屈折率の周期的分布により励起光および蛍光が超音波周波数により強度変調される。蛍光物質が超音波の音場焦点にある場合と焦点から外れている場合では変調信号強度に差が生ずることから蛍光源の位置情報を抽出することができる。

図3に計測系のブロック図を示す。光源にはAr⁺レーザー（発振波長488nm, CW）を用い、超音波(CW)伝搬方向が入射レーザービームに直交するよう、共振周波数1MHzの水中用超音波トランスデューサを透明アクリル水槽側面に設置した。光軸上の両側面には光ビーム透過用のガラス窓を取り付けた。光散乱媒質中において集束超音波音場により変調された散乱蛍光を外部に設置した光電子増倍管(PMT)でバンドパス干渉フィルター(中心波長540nm,半値幅20nm)を介して検出した。アクリル水槽内部には、光散乱媒質を入れるための小型水槽(50×50mm)を設置した。実験では、直径3mm,高さ10mmに固形成形した蛍光色素(Fluorescein, 蛍光波長528nm)を、散乱媒質を満たした小型水槽の中央に配置し生体模擬試料とした。外側の水槽を光軸に平行および垂直方向に移動可能な2次元自動ステージ上に設

置し、その移動により超音波音場焦点が内側の小型水槽内部を2軸走査する構成とした。PMTで検出した光信号はスペクトラムアナライザによる検波の後パーソナルコンピュータに記録した。実験では、2軸ステージを光軸方向に500μm間隔で12mm,超音波伝搬軸方向に500μm間隔で8mm移動させ、各点で変調信号成分を検出し、得られた信号を二次元強度分布画像として表示した。実験では光散乱媒質としてIntralipid-10%溶液を蒸留水で希釈して使用した。

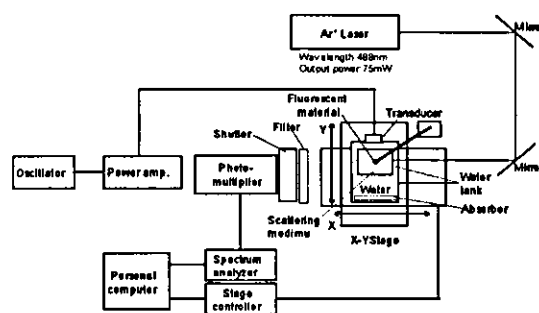


図3 音響光学効果を利用した蛍光イメージングシステムのブロック図

(倫理面への配慮)

動物生体は本研究では使用していない。

C. 研究結果

①蛍光分光イメージング法

厚さ23mmのロース肉を量子ドット試料に載せて測定した結果を図4に示す。得られたデータから、蛍光試料直上部位での蛍光スペクトルと、量子ドットを除いて測定した、同じ場所での肉の自家蛍光スペクトルを重ねて表示した。また、両者の差スペクトルも併せて表示した。量子ドットの蛍光波長800nmに対応したスペクトル分布が差スペクトルにより

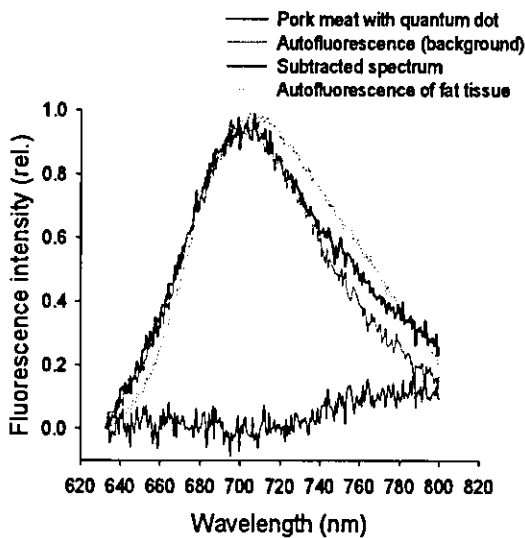


図4 厚さ23mmのブタロース肉下に量子ドット試料を設置して計測された蛍光スペクトルの自家蛍光スペクトルとの比較、および両者の差スペクトル（点線は脂肪の自家蛍光）

得られている。なお図4には点線でブタ脂肪の自家蛍光スペクトルも表示したが、ロース肉自家蛍光スペクトルとのパターン相違がわかる。このスペクトルパターン相違を強調するようスペクトルパターン分析処理を行い画像化した結果を図5に示す。観察範囲は約50×50mmであるが、画像中央を中心にかなり広い範囲で蛍光が広がっている様子がわかる。厚さ23mmの組織で多重散乱されたためこのような広がりをもって観測されたわけであるが、もとよりこの方法は空間分解能を要求しない微弱蛍光の定量検出が目的であるため、このような広がりをもって観測されても、その蛍光強度がターゲットとなる蛍光物質に由来するものであることを分光的に保証することのできる本手法は、その目的を十分達しうると

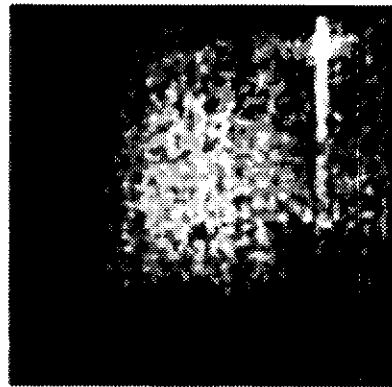


図5 23mm厚ブタロース肉下に量子ドット試料を設置して計測された分光画像データから再構成した量子ドット由来の蛍光画像

考えられる。しかしそのためには、測定対象の詳細な自家蛍光スペクトルデータ、とくに皮膚の自家蛍光スペクトル特性データのデータベース化やそれに基づく分析アルゴリズムのさらなる改良が必要である。

② 蛍光寿命イメージング法

トリムネ肉の等価散乱係数は波長633nmにおいて 1.21mm^{-1} とされており、大脳皮質の等価散乱係数 3.78mm^{-1} より小さいが、蛍光寿命画像計測の有効性評価にとって十分であると考えられる。深さ7mmに包埋した場合の計測結果を図6に示す。この結果から、長い蛍光寿命をもつ蛍光マーカ由来の蛍光画像が自家蛍光と弁別されて200ns以降に検出されている様子がわかる。このことから時間分解蛍光寿命計測の有効性が確認され、10～20mm程度であれば生体組織深部にあっても、本手法によりその蛍光物質由来の蛍光情報を抽出することが可能であることが示唆された。

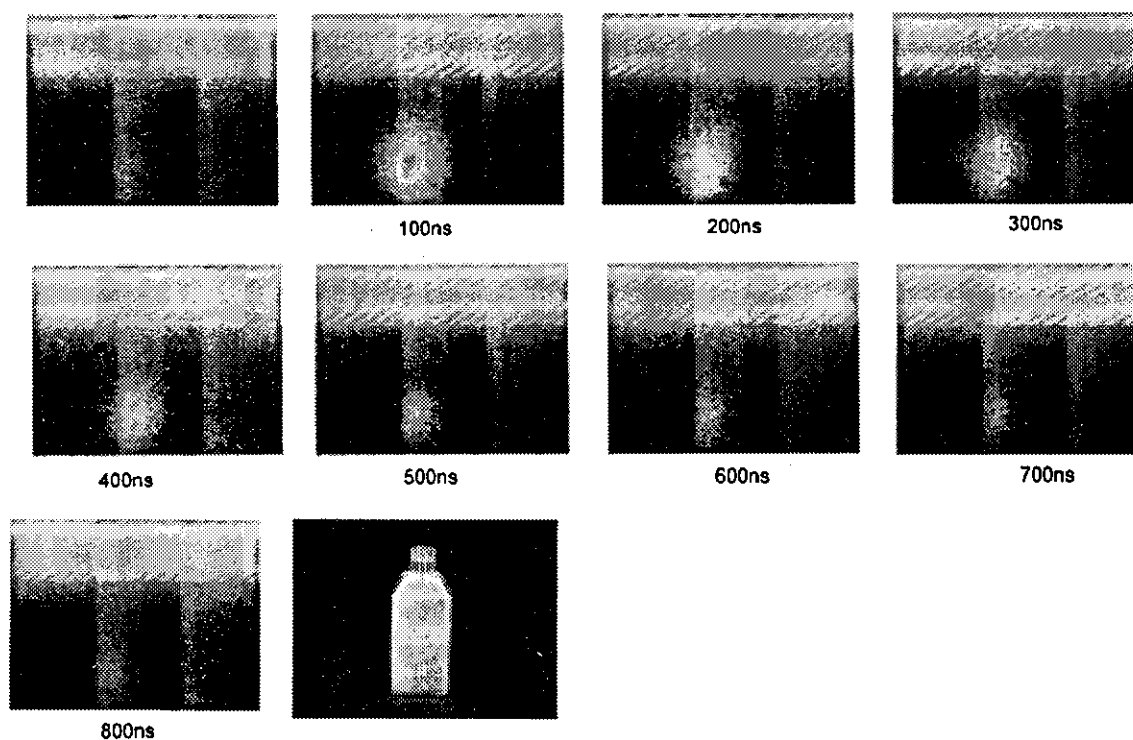


図6 トリムネ肉内部深さ 7mm に量子ドットを包埋した生体模擬試料による蛍光寿命時間分解画像計測結果 (時間ゲート幅 100ns)。写真はトリムネ肉に蛍光体 (量子ドット) を包埋した測定試料のようす。

③音響光学効果を利用した蛍光イメージング法

図7は, Intralipid-10%溶液を体積濃度 100ml/L で希釈して散乱媒質としたときの測定結果であるが, 走査範囲のほぼ中心付近に蛍光物質が局在している様子がわかる。図8は, 走査範囲中心付近の信号強度分布の X 軸上のプロファイルを表示したものである。信号ピークの半値全幅は約 3mm であり, その位置は蛍光体の配置位置と一致し, また半値幅もほぼ蛍光体の直径と一致している。レーザー光は光散乱媒質中で散乱されているため, 蛍光体が水槽内のどの位置にあっても, 蛍光

を発するが, 1MHz で変調された蛍光成分は蛍光体が音場焦点にあるときに最も強くなり, 焦点から外れると散乱により急激に弱くなるため, 蛍光体の位置を同定することができたと考えられる。ここで用いた散乱体濃度においては, 目視での内部観察はまったく不可能であった。しかし, 本手法により, 蛍光源の位置情報を 1mm 程度の分解能で抽出することができた。これらの結果から超音波-光相互作用を利用した蛍光イメージング法は, 光散乱媒質中内部の蛍光物質分布の測定に有効であることがわかった。

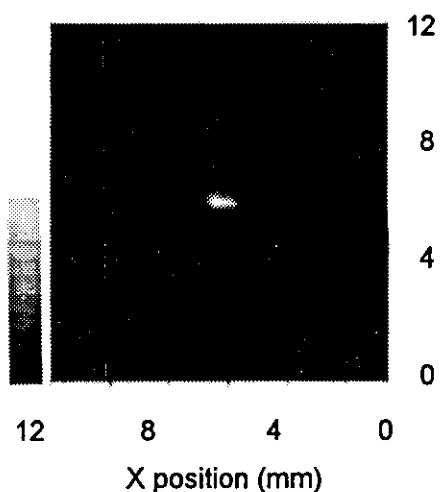


図7 散乱媒質内の蛍光強度分布の画像計測結果

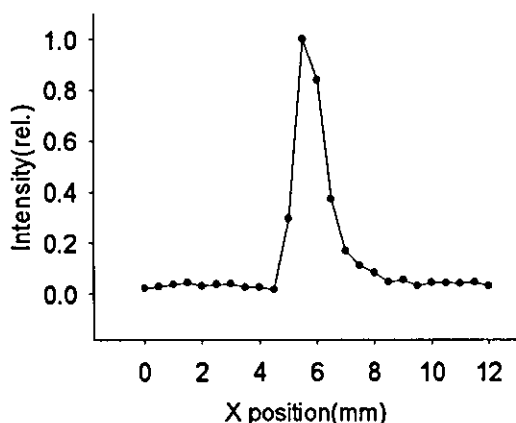


図8 試料中心付近のX方向の蛍光強度分布

D. 考察

生体内に分布したナノセンシング・カプセルからの蛍光を生体外において高感度に画像検出する上で、検出限界を制限する背景光ショット雑音の中から選択的にターゲット蛍光物質由来の蛍光を検出する方法として蛍光分光イメージング法と時間分解蛍光寿命イメージング法について検討した。生体試料を用いて行った実験では、従来法では検出不可能であった深部蛍光を選択的に抽出することができた。

本年度は比較的均質な生体試料を用いているが、実際の生きた生体では、皮膚の光学特性など考慮すべき点もまだ多い。今後、大型の動物を使った実験・検討が望まれる。これらの手法は自家蛍光との分離が目的であり、散乱による解像度の劣化については改善することはできない。その点を考慮し、本研究では、生体深部蛍光を高分解画像化する技術について、集束超音波を利用した新しい蛍光画像計測法について検討を行った。生体模擬試料を用いた基礎実験の段階ではあるが、50mm程度厚さの生体組織内部の蛍光を1mm程度の分解能で計測することが可能との示唆を得ることができた。今後はこれらの技術を統合した計測系のシステム化を図ることにより、ヒトを対象としたセンチネルリンパ節臨床検査装置へと成果を結実させることが可能であると考えられる。

E. 結論

本研究において目的とした、生体内ナノセンシング・カプセル高感度・高解像・非侵襲画像計測システムの構築を達成することができ、またその実用化に向けた基礎データを取得することができた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Kobayashi: Spontaneous ultraweak photon emission of living organisms -biophotons - phenomena and detection techniques for extracting biological information, *Trends in Photochem. Photobiol.*, Vol. 10, pp. 111-135 (2004)

2. 学会発表

Masaki Kobayashi: In vivo visualization of oxidative stress based on highly sensitive biophoton imaging. International congress on toxicology (Nova Gorica, Slovenia) (September, 2004)

Masaki Kobayashi: Highly sensitive imaging of biophoton from human bodies using a cooled-CCD camera system. Biophotonics Summer School 2004 (Neuss, Germany) (August, 2004)

渋谷幸弘, 小林正樹, 榎本幹: 超音波-光相互作用を利用した生体内蛍光イメージング法の基礎検討, 平成 17 年電気学会全国大会講演論文集, 講演番号 3-010, 第 3 分冊 p14 (2005)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 大内憲明, 榎本幹: 癌生物フォトン発光の高感度画像計測システムの開発と医用計測応用 I, 平成 17 年第 52 回応用物理学会関係連合講演会講演予稿集, 論文番号 3p-YN-4, p. 1450 (2005)

小林正樹: バイオフォトンイメージングと生体計測への応用, 第 6 回分子ダイナミック分光ワークショップ講演要旨集 (2004)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 中島護雄, 多田寛, 大内憲明, 榎本幹: 蛍光微粒子を用いたセンチネルリンパ節蛍光画像計測法の検討, 平成 17 年度東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-3-22, 講演資料 p43 (2005)

武藤修, 乾拓也, 橋本克哉, 小林正樹, 榎本幹: 量子ドットを用いた生体機能計測のための蛍光画像分光システムの開発, 平成 17 年度東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-3-21, 講演資料 p41 (2005)

表沢俊亮, 武田修治, 小林正樹, 榎本幹:

超高感度 CCD を用いたヒト生物フォトン画像検出とその生体情報計測への応用, 平成 17 年度東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-3-50, 講演資料 p99 (2005)

今野淳, 水野麻弥, 小川雄一, 松木英敏, 小林正樹, 川瀬晃道, 榎本幹: 蛍光色素法を用いたミリ波照射による PC12 の膜電位変化の計測, 平成 17 年度東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-3-38, 講演資料 p75 (2005)

武田敏英, 小川雄一, 水野麻弥, 小林正樹, 川瀬晃道, 榎本幹: ミリ波帯電波を利用したアクティブ反射イメージング, 平成 17 年度東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-3-39, 講演資料 p77 (2005)

深澤勝, 小林正樹, 奥山智浩, 榎本幹: 超高感度 CCD によるヒト生物フォトン発光画像計測システムの開発と生体計測への応用の検討 I, 平成 16 年第 65 回応用物理学会学術講演会講演予稿集, 論文番号 3p-2T-9, p. 1141 (2004)

表沢俊亮, 深澤勝, 奥山智浩, 小林正樹, 榎本幹: 超高感度 CCD によるヒト体表生物フォトン発光画像計測システムの開発と生理情報計測への応用 I, 平成 16 年度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, p. 349, 講演番号 2J6 (2004)

深澤勝, 表沢俊亮, 奥山智浩, 小林正樹, 榎本幹: 超高感度 CCD によるヒト体表生物フォトン発光画像計測システムの開発と生理情報計測への応用 II, 平成 16 年度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, p. 350, 講演番号 2J7 (2004)

鈴木聡, 小林正樹, 武田元博, 中島護雄, 多田寛, 大内憲明, 榎本幹: 量子ドットナノ粒子を用いたセンチネルリンパ節診断のための蛍光寿命時間分解画像計測システムの開発, 平成 16 年度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, p. 351, 講

演番号 2J8 (2004)

笠松隆史, 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音場の可視化Ⅱ, 平成 16 年度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, p. 352, 講演番号 2J9 (2004)

渋谷幸弘, 小林正樹, 榎本幹: 超音波を利用した散乱媒質中における蛍光イメージング法の基礎検討, 平成 16 年度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, p. 353, 講演番号 2J10 (2004)

S. Suzuki, M. Kobayashi, M. Takeda, N. Ohuchi, M. Enomoto: In vivo imaging of biophoton originating from malignant

tumor with using a highly sensitive CCD camera system, 平成 16 年度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, p. 3, 講演番号 1A3 (2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許

「蛍光断層画像計測装置」特願2004-240739

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）

CdSe ナノ粒子を用いた癌細胞イメージング

（分担）研究者 樋口 秀男 東北大学大学院工学研究科

研究要旨

蛍光性のナノ粒子である蛍光ビーズや CdSe 粒子は有機蛍光分子よりも蛍光を発する時間が長く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。本年度は 1. 蛍光性ナノ粒子のナノメートルの運動を観察する方法を開発した。2. 細胞内で 3 次元的にナノ粒子を観察する方法を確立した 3. 白血球細胞の 1 つであるマクロファージの食食機能に注目し、ナノ粒子に対するこの細胞の食食を調べ、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。

1. 蛍光性ナノ粒子を用いたモーター蛋白質のステップ運動のイメージング

モーター蛋白質はレール蛋白質上を滑走運動し、筋運動、細胞内物質輸送、神経情報伝達など、生体のあらゆる「動き」を担う生体ナノマシンである。モーター蛋白質の研究における工学的な意味は、ナノレベルで機能するモーター蛋白質・レール蛋白質のシステムを利用し、ドラッグデリバリーや人口筋肉などの可能性を探り、その実現を目指すことである。そのためには、まず細胞内でモーター蛋白質が「どこで」、「どのように」機能しているかを精密に知る必要がある。そこで、我々は nm、ms の分解能を有し、細胞内でも使用可能な、モーターの運動の観察・計測方法を構築した。

結像面における回折限界以下の大きさの粒子の蛍光強度は、近似的にガウス分布に従う。

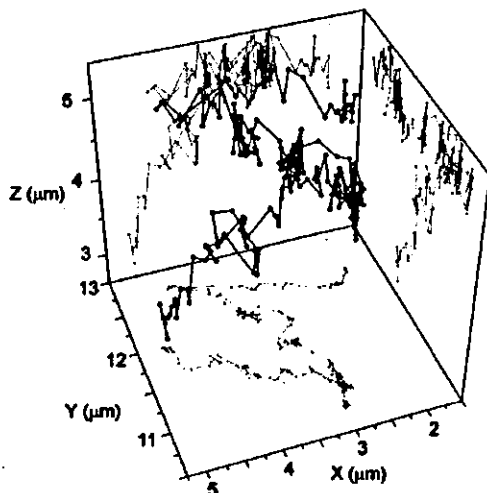
蛍光粒子の位置変化は蛍光強度分布の変化に対応しており、安定で S/N 値の高い蛍光強度分布をもつ蛍光像を得ることができれば、光学観察で 1nm の精度で計測することが可能である。我々は蛍光強度が強いポリスチレンビーズ(200nm)と CdSe 量子ドット(-15nm)の 2 つを蛍光標識とし、安定で S/N 値の高い画像を得た。蛍光画像の取得には最大画像取り込み速度 2ms/frame の高速冷却型 CCD カメラを使用した。この CCD は、受光面で発生した信号を、1 千倍にまで高める機構を有しており、わずか 2ms の露光時間で、S/N 値の高い蛍光画像を得ることができる。また精密計測に大きく影響の与える装置の機械的振動を除去するために、顕微鏡の改良を行った。以上の手法によって我々はポリスチレンビーズで 4nm/2ms、CdSe 量子ドットで 8nm/2ms

の高い分解能を有する運動観察・計測系を構築することに成功した。実際に、モーター蛋白質であるミオシン V やキネシンの in-vitro 系で運動計測を行った所、2ms の時間分解能でそれぞれの最小ステップである 36nm、8nm のステップ計測に成功した。

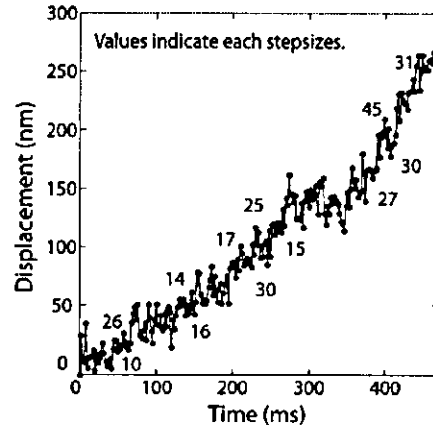
2. CdSe 粒子を用いたモーター蛋白質の細胞内三次元ナノイメージング

生体内で働く蛋白質は、生物を構成するナノマシンである。特にモーター蛋白質と呼ばれる蛋白質は、わずか数 nm ながら、酵素反応、エネルギー変換、自己組織化などの機能を集約的に持ち、筋収縮、細胞運動、細胞分裂、シナプス輸送等を担っている。モーター蛋白質は、ATP を加水分解することによる化学エネルギーを入力として、レール蛋白質と呼ばれるフィラメントの上を一方向に運動する。モーター蛋白質は、まさに生体内リニアモーターである。ドラックデリバリーや人工筋肉など、モーター蛋白質の生体利用を実現させるためには、モーター蛋白質が、生きた細胞、あるいは、組織内で実際に機能する現場を詳細に観察する必要がある。

我々は、モーター蛋白質の運動を、CdSe 蛍光粒子を膜蛋白質に結合させ、そのエンドサイトーシスや小胞輸送を指標として観測した。まず、全反射照明を用いて細胞膜付近のモーター蛋白質の運動を、二次元的に観測した。独自に開発した顕微鏡を用いて、細胞膜



付近での CdSe 粒子の運動を nm 精度で観察した。その結果、モーター蛋白質の運動を約 8nm/2ms で観察することに成功した。細胞膜上では 15~45 nm の階段状の運動が観察された(右図)。



細胞内に取り込まれた CdSe 粒子が細胞内部で輸送される過程は、従来の顕微鏡の様な二次元情報のみの観察では、困難である。そこで我々は、蛍光粒子 CdSe の運動を実時間で 3 次的に観察できる顕微鏡システムを構築した。本システムは、330ms 毎に 9 枚の共焦点像を取得し、ひとつの 3 次元画像を構築する。CdSe 粒子の 3 次元位置は、蛍光強度を重みとした輝点の重心を計算することで求められる。位置精度は、CdSe 単粒子では、水平方向~20nm、垂直方向~60nm であり、CdSe を数粒子凝集させると、水平方向~6nm、垂直方向~25nm であった。我々は本手法を用いて、モーター蛋白質が細胞内で機能する様子を 3 次的に実時間で観察することに成功した(左図)。

CdSe ナノクリスタルを用いた白血球と乳癌細胞の相互作用イメージング

乳癌の内約 30% の細胞表面には HER2 と呼ばれる受容体が過剰発現している。この受容体に対する抗体ハーセプチンは乳癌細胞に結合して、増殖を抑制するため、癌の治療薬として使われている。また、抗体を結合した乳

癌細胞は免疫細胞や食食細胞（好中球，マクロファージ，キラーT細胞など）によって選択的に増殖が抑えられているとも言われている。しかしながら，どの免疫細胞がどのように癌細胞を攻撃するかについては不明である。我々は，乳がん細胞の増殖が，食食細胞であるマクロファージにより抑制される条件を見だし，そのときの乳癌細胞に対するマクロファージの相互作用の過程を蛍光性 CdSe ナノクリスタルを用いて調べた。20nM の抗体ハーセプチンにより乳癌細胞（KPL-4）の増殖速度が落ちた。さらにマクロファージを加えたところ，増殖はさらに抑制された。これにより，マクロファージには乳細胞の増殖効果があることが確かめられた。次に，抑制効果を分子レベルで探るために，蛍光強度が強い CdSe ナノクリスタルをハーセプチンに架橋し，これを乳癌細胞に反応させ，マクロファージを加えて相互作用の可視化を行った。CdSe-ハーセプチンが結合した乳癌細胞はマクロファージと相互作用をして，マクロファージに食食された。CdSe 蛍光の輝点の変位を追跡した結果，乳がん細胞側からマクロファージ内へ輝点が移動していく様子が見られた。輝点の位置変化の解析から，食食過程には，細胞質の粘性や細胞内輸送タンパク質分子などの関与を受けた運動が複合して働いていることがわかった。

研究発表

1. 論文発表

1) Higuchi H, Bronner CE, Park HW,

and Endow SA. Rapid double 8-nm steps by a kinesin mutant. *EMBO J.* 23:2993-9, 2004/7

2) Uemura S, Higuchi H, Olivares AO, De La Cruz EM, and Ishiwata S. Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor. *Nature Struct Mol Biol.* 11:877-83, 2004/9

3) Yanai, M. J.P. Butler, T. Suzuki. H. Sasaki and H. Higuchi. Regional rheological differences in locomoting neutrophils. *Am.J.Physiol.* 287,C603-11, 2004/9

4) Takashi Kamei, Seiji Kakuta, and Hideo Higuchi. Biased Binding of Single Molecules and Continuous Movement Of Multiple Molecules of Truncated Single-Headed Kinesin. *Biophysical Journal*, 2004 /12

5) Nguyen Hoa Anh and Hideo Higuchi. Motility of myosin V regulated by the dissociation of single calmodulin. *Nature Struct Mol Biol*, 2005, in press

2. 雑誌の総説・解説

1) 西山雅祥, 樋口秀男「キネシンの運動解析から見えてきた熱ラチェットメカニズム」生物物理 44, 75-80, 2004/4

2) 加世田国与士, 樋口秀男, 広瀬恵子「キネシンは本当に歩くか」実験医学 22, 865-868, 2004/4

3) 白川昌宏, 樋口秀男「イメージング-特集にあたって」生物物理 44 巻 6 編集, 2004 / 12

3. 学会発表

(国際学会)

- 1) G. Sazaki, M. Okada, T. Matsui, H. Higuchi, K. Tsukamoto, K. Nakajima, "In situ observation of elementary growth steps on protein crystals and individual protein molecules diffusing in the vicinity of crystal surfaces", 10th International Conference on Crystallization of Biological Macro molecules, Beijing, China, June 5-8, 2004
- 2) M. Okada, G. Sazaki, T. Matsui, H. Higuchi, K. Nakajima, "In situ observation of diffusing process of individual protein molecules in the vicinity of crystal surfaces", 10th International Conference on Crystallization of Biological Macro molecules, Beijing, China, June 5-8, 2004.
- 3) G. Sazaki, M. Okada, T. Matsui, H. Higuchi, K. Tsukamoto, K. Nakajima, "Development of novel in situ techniques for the observations of elementary growth steps on protein crystals and individual protein molecules diffusing in the vicinity of crystal surfaces", 14th International

Conference on Crystal Growth and 12th International Conference on vapor growth and epitaxy, Grenoble, France, August 9-13, 2004.

(国内学会)

- 1) 高木直, 樋口秀男「生細胞内における CdSe ナノクリスタルの 1 粒子検出」ナノ学会第 2 回学会, 2004 / 5, 東京
- 2) 佐藤崇, 樋口秀男「蛍光性 CdSe 粒子によるモーターたんぱく質高精度位置解析」ナノ学会第 2 回学会, 2004 / 5, 東京
- 3) 亀井敬, 角田世治, 樋口秀男「単一生体ナノモーターの協同的な高次運動機能」ナノ学会第 2 回学会, 2004 / 5, 東京
- 4) 亀井敬, 佐藤崇, 渡辺朋信, 樋口秀男「ナノ粒子を標識したモータータンパク質の動きの nm, ms ぶんかい能計測」ナノ学会第 2 回学会, 2004 / 5, 東京
- 5) 多田寛, 佐竹正延, 亀井尚, 武田元博, 中島護雄, 樋口秀男, 粕谷厚生, 小林正樹, 川添良幸, 大内憲明「CdSe ナノクリスタルを用いた HER 2 発現 乳癌細胞の蛍光イメージング」ナノ学会第 2 回学会, 2004 / 5, 東京
- 6) HoaAnh Nguyen, Naoya Sasaki and Hideo Higuchi. "Actin-binding affinity and motility of myosin V regulated by dissociation of single calmodulin" The 57th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, 2004 / 5, Osaka

- 7) Naoya Sasaki, Sotaro Uemura, Shinichi Ishiwata and Hideo Higuchi. "Mechano-chemical coupling of single Myosin V molecules examined by photolysis of caged_ATP" The 57th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, 2004 / 5, Osaka
- 8) Yasushi Okada, Hideo Higuchi and Nobutaka Hirokawa. "Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin" The 57th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, 2004 / 5, Osaka
- 9) 岡田雅史, 佐崎 元, 松井拓郎, 渡辺朋信, 樋口秀男, 中嶋一雄「タンパク質の1分子観察:結晶表面近傍での拡散挙動」, 第34回結晶成長国内会議, 2004/8, 東京農工大学
- 10) 多田寛, 佐竹正延, 亀井尚, 樋口秀男, 大内憲明「CdSe ナノクリスタル・Trastuzumab complex を用いたHER2 発現乳癌組織の in vivo 蛍光イメージング」, 第63回日本癌学会総会, 2004/9, 福岡
- 11) 渡辺朋信, 樋口秀男「3次元単粒子追跡法の開発:乳癌細胞における膜表面受容体の運動を立体的に観る」日本生物物理学会 第42回年会講演, 2004/12, 京都
- 12) 高木直, 樋口秀男「ナノ粒子追跡による細胞間相互作用の可視化」日本生物物理学会 第42回年会講演, 2004/12, 京都
- 13) 佐藤崇, 渡辺朋信, 樋口秀男「蛍光性 CdSe ナノ粒子を用いたモータータンパク質の無負荷・高精度の運動解析法の開発」日本生物物理学会 第42回年会講演, 2004/12, 京都
- 14) Nguyen Hoa Anh, 樋口秀男「Motility of myosin_V regulated by dissociation of single calmodulin molecules」日本生物物理学会 第42回年会講演, 2004/12, 京都
- 15) 亀井敬, 樋口秀男「単頭キネシンモーター複数分子の振動運動」日本生物物理学会 第42回年会講演, 2004/12, 京都
- 16) 鳥羽栞, 亀井敬, 樋口秀男, 豊島陽子「細胞質ダイニン1分子運動特性」生体運動研究合同班会議, 2005/1/7, 千里ライフサイエンスセンター 大阪
- 17) 渡辺朋信, 樋口秀男「細胞内蛍光粒子の三次元ナノイメージング」生体運動研究合同班会議, 2005/1/7, 千里ライフサイエンスセンター 大阪
- 18) 樋口秀男, 渡辺朋信, 佐藤崇「ミオシンVの高分解能イメージングとステップ解析」生体運動研究合同班会議, 2005/1/9, 千里ライフサイエンスセンター 大阪
- 19) 岡田雅史, 佐崎 元, 松井拓郎, 渡辺朋信, 樋口秀男, 中嶋一雄「結晶表面近傍でのタンパク質分子拡散挙動の1分子その場観察」, 応用物理学会,

2005 / 3, 埼玉大学

4. 招待講演

(国際)

1) Hideo Higuchi

「Biased Binding, Processive Steps and Oscillatory Movement of Single-headed Kinesin」 Structural Insights into Kinesin Function, 2004 / 12, Washington U.S.A

2) Hideo Higuchi 「Nano-biology and nano-medicine on cancer cells」 NanoScience and Technology for Medical Applications, 2005/2/15, Sendai

(国内)

1) 樋口秀男, 「微小管の重合・脱重合: 原子から細胞そして固体へ」, 第42回年会講演, 日本生物物理学会, 2004 / 12, 京都

2) 樋口秀男, 「ナノイメージング」分子イメージング勉強会, 厚生労働省, 2004 / 5 / 11, 東京

3) 樋口秀男, 「生物の運動メカニズム」早稲田大学, 2004 / 8, 東京

4) 樋口秀男, 「生体ナノシステム」室蘭工業大学, 2004 / 10, 北海道

5) 佐崎 元, 岡田雅史, 松井拓郎, 樋口秀男, 渡辺朋信, 塚本勝 男, 中嶋一雄, 「タンパク質結晶表面での単位成長ステップおよび表面拡散分子のその場観察: 巨大分子を利用することで成長素過程を明らかにする」, 第34回結晶成長国内会議バルク分科会シンポジウム, 2004 / 8, 東京農工大学,

6) 樋口秀男, 「分子モーターの動作機構を探る」東京工業大学, 2005 / 1 / 28, 東京

6. 特許

特許 出願番号: 2004_303004 「単粒子三次元位置追跡方法」 平成 16 年 10 月 18 日, 渡邊朋信, 樋口秀男