

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14～平成16年度 総合研究報告書

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

目 次

I. 総合研究報告

- 「ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用」 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および
X線造影剤開発に関する研究」 13
武田 元博、石田 孝宣、佐竹 正延
2. 「量子力学計算による医療用新物質探索と物性予測」 20
川添 良幸、水関 博志
3. 「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」 25
粕谷 厚生
4. 「高感度センチネルリンパ節蛍光検出生検法」 31
小林 正樹
5. 「CdSe ナノ粒子を用いた癌細胞イメージング」 41
樋口 秀男
6. 「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」 47
小林 芳男

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 別紙1 雑誌論文 51
- 別紙2 書籍 55
- 別紙3 学会発表 57
- 別紙4 特許 61

IV. 研究成果の刊行物・別刷 63

I. 総合研究報告

ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用

（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、CdSe ナノ粒子の原子構造決定、乳がん細胞膜蛋白に対するモノクローナル抗体・量子ドット蛍光ビーズ複合体及びシリコンナノ蛍光マーカを作成し、超高感度な蛍光計測系を確立した。

1. 金属内包シリコンフラーレンの理論設計と CdSe ナノ粒子の原子構造決定：第一原理シミュレーション計算により、がんを標的とした医療用ナノ物質を設計した。金属内包シリコンフラーレンを理論設計し、CdSe ナノ粒子の構造決定、物性算定した。径 1 nm の新物質で従来と全く異なる物性が期待される。全電子混合基底法と拡散量子モンテカルロ法を開発、ナノ物質の構造決定と微妙なエネルギー差を持つ複数量子の基底状態確定を可能とした。

2. 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) 高発光効率寿命量子ドットの開拓：量子ドット CdSe 表面を酸化に強い Cd(OH)₂ で覆い、低毒性の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。

2) 径 1 nm CdSe 及び Si 系量子ドット合成：医療応用には、初めから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、1 nm の籠状 CdSe 量子ドットが安定に存在することを見出し、(CdSe)₃₃ と (CdSe)₃₄ は逆ミセル法で大量に合成する方法も開発した。シリコン系についても Si₁₄ 系ドットの作製を試みた。

3) 自己安定型超耐久性量子ドットの作製：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。

3. CdSe ナノ粒子による乳がん細胞イメージング：量子ドットによる細胞内単分子イメージングに成功した。高速 3 次元ナノ顕微鏡を開発し、タンパク質や受容体の動態解析に向けて、QD-抗 HER2 抗体複合体を作製し、乳がん培養細胞株移植ヌードマウスで、in vivo イメージング観察に成功した。今後、細胞レベルでの診断や DDS の研究などへの応用が期待される。

4. 蛍光ナノ粒子がん画像診断法の開発：がん手術におけるセンチネルリンパ節 (SN) 生検への応用を目指し、蛍光ナノ粒子トレーサーとした SN 生検法を開発した。

5. 蛍光ナノ粒子による新たな造影剤開発：新たな画像診断法の開発に向けて、X 線造影剤として非アレルギー性シリカ AgI ナノビーズを作製した。

我々の研究グループは、目的とする機能を持つナノ粒子を分子設計し、作製した上で、医療に応用するという、これまでにない画期的な体制を有した国際的にもほとんど例を見ないグループである。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（東北大学院工学研究科、助教授）

A 研究目的

1 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、元素や分子を内包しうる物質として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ル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ルーレン・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ルーレンネットワーク等分子設計グループ（川添、水

関ら）、フル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）をそれぞれ形成し、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を用いたフルーレン様ネットワーク物質の分子設計（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、これらを用いてスーパーコンピュータによる分子設計を行い、これまで存在が知られなかった物質や新規の有用な分子構造を持つ薬品を設計、蛍光特性や活性酸素生成能等、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、佐竹ら）：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. 医療用蛍光試薬の開発（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. 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）：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。さらに新たなナノサイズ・センシングカプセルの応用として、生体内の単分子検出技術の確立を目ざし、CdSe粒子に抗体を架橋させた試料を作製し、次いで免疫細胞に貪食される様子を観察する。

5. 癌のセンチネルリンパ節生検に必要なセンシングカプセルの条件検討ならびに蛍光画像計測装置の評価（小林正樹、武田、石田、佐竹ら）：上記で得られた試薬を実際に動物モデルに応用し、目的病変の検出を試み、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。生体極微弱発光計測技術に応用し、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。

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様ネットワーク物質の分子設計；金属内包シリコンフラーレンの理論設計とCdSeナノ粒子の原子構造

決定など（川添、水関ら）

本研究では、第一原理シミュレーション計算による新しい設計法を、がん治療を主目的とした医療用ナノスケール物質設計に初めて適用した。注目すべき成果として、金属内包シリコンフラーレンの理論設計とCdSeナノ粒子の原子構造決定と物性算定が挙げられる(Nature Mat, 2004)。これらは径約1nmの籠状構造を持つ新物質であり、従来と全く異なる特異な物性が期待される。さらに殺細胞効果が期待されるシングレット状態の酸素分子の電子状態精密解析のため、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が存在する場合の基底状態確定が可能となった(J Phys Chem, 2004)。本方法を用い、生体構成要素として重要なポルフィリンの組合せによって、ナノスケールの発光波長を可変にする方策を理論的に検討した。その結果、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ることを確認した(Molecular Simulation 2004)。

2. 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（粕谷、小林芳ら）

1) 高発光効率寿命安全性量子ドットの開拓

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に表面を酸化

に強いCd(OH)₂で覆い、更に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(第12回微粒子と無機クラスター国際シンポ、2004)。

2) 径1 nmの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ためには1 nm程度の量子ドットが必要であり、初めから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、1 nmのCdSe量子ドット(CdSe)₁₃、(CdSe)₁₉、(CdSe)₃₃、(CdSe)₃₄、(CdSe)₄₈、等が籠状で安定に存在することを見出し、(CdSe)₃₃と(CdSe)₃₄に関しては逆ミセル法で大量に合成する方法も開発した(Nature Materials、2004)。シリコン系についてもSi₁₄系ドットの作製を試みた(特許申請済)。

3) 自己安定型超耐久性量子ドットの作製

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。

3. CdSe ナノクリスタルによるHER2発現乳がん細胞の蛍光イメージング(樋口ら)

樋口らは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(EMBO J、2004)。現在タンパク質や受容体の動態解析に向けて精力的に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、ヒト乳がん培養細胞株 KPL-4 ノードマウスの尾静脈より投与、in vivo イメージングシステムを用い観察した。がん組織に集積した蛍光像を体外から描出し、独自に開発した3D蛍光顕微鏡システムを用いて、投与後に生体で複合体が担がんマウス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。今後、がんの細胞レベルでの診断や転移診断、薬物とQDを結合させることによる薬物動態の研究などへの応用が期待される。

4. 蛍光ナノ粒子を用いた新たながん画像診断法の開発

近年、乳がん手術にセンチネルリンパ節(SN)生検が適用されつつあるが、RI法や色素法によらない、新たな蛍光ナノ粒子によるSN生検法を開発した。武田、小林(正)、石田らは生体極微弱発光(フォトン)研究を進展させ、高感度、超低ノイズな2次元微弱光計測装置の開発と腫瘍細胞からのフォトンの計測に成功(Cancer Sci., 2004)し、さらに、新たな検出法としてサイズの均一な蛍光ナノビーズを用いたSN生検を考案、動物実験にて検討した。その結果、蛍光ビーズをトレーサーとして用いたSNの検出は可能であり、造影されたリンパ節の蛍光顕微鏡観察により、蛍光ビーズがSNに取り込まれているのが確認できた(Cancer Sci, in press)。ビーズの生体安全性確保のためのシリカコーティングはフォトニック微粒子を利用したナノ医療分野に大きく貢献するものと思われる。小林(芳)、武田らは新たな蛍光ナノ粒子による画像診断

法に取り組んでおり (Physicochem. Eng. Aspects, 2004)、新たな X 線造影剤として非アレルギー性シリカ AgI ナノビーズを開発中である (Colloids and Surfaces A, 2004)。

1. スーパーコンピュータ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) : 本研究では、第一原理シミュレーション計算による新しい設計法を、がんを主とした医療用のナノスケール物質設計に適用した。注目すべき成果として、金属内包シリコンフラーレンの理論設計と CdSe ナノ粒子の原子構造決定と物性算定がある (Nature Mat, 2004)。これらは径約 1 nm の新物質であり、従来と全く異なる特異な物性が期待される。殺細胞効果が期待されるシングレット状態の酸素分子の電子状態精密解析のため、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が存在する場合の基底状態確定が可能となった (J Phys Chem, 2004)。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って、ナノスケールの発光波長を可変にする方策を理論的に検討した。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ることを確認した (Molecular Simulation 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)。現在、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. ナノサイズ・センシングカプセルの開発 (粕谷、小林芳男ら)

1) 高発光効率寿命安全性量子ドットの開拓

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 に表面を酸化に強い $\text{Cd}(\text{OH})_2$ で覆い、更に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 (第 12 回微粒子と無機クラスター国際シンポ, 2004)。

2) 径 1 nm の 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ためには 1 nm 程度の量子ドットが必要であり、初めから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、1 nm の CdSe 量子ドット $(\text{CdSe})_{13}$ 、 $(\text{CdSe})_{19}$ 、 $(\text{CdSe})_{33}$ 、 $(\text{CdSe})_{34}$ 、 $(\text{CdSe})_{48}$ 、等が籠状で安定に存在することを見出し、 $(\text{CdSe})_{33}$ と $(\text{CdSe})_{34}$ は逆ミセル法で大量に合成す

る方法も開発した (Nature Materials, 2004)。シリコン系についても Si_{14} 系ドットの作製を試みた (特許申請済)。

3) 自己安定型超耐久性量子ドットの作製

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. 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移植ヌードマウスの尾静脈より投与、*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貪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貪食されやすくなる。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、貪食されたナノ粒子の鮮明な像を長時間測定できた。また貪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、マクロファージが貪食する瞬間を観

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。

5. 蛍光画像計測装置の評価、応用 (小林、武田、石田ら) :

近年、乳がん手術にセンチネルリンパ節 (SN) 生検が適用されつつあるが、RI法や色素法によらない、新たな蛍光ナノ粒子によるSN生検法を開発した。武田、小林 (正)、石田らは生体極微弱発光 (フォトン) 研究を進展させ、高感度、超低ノイズな2次元微弱光計測装置の開発と腫瘍細胞からのフォトンの計測に成功 (Cancer Sci., 2004) し、さらに、新たな検出法としてサイズの均一な蛍光ナノビーズを用いたSN生検を考案、動物実験にて検討した。結果、蛍光ビーズをトレーサーとして用いたSNの検出は可能であり、造影されたリンパ節の蛍光顕微鏡観察により、蛍光ビーズがSNに取り込まれているのが確認できた (Cancer Sci, *in press*)。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。

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試され

ていない物性をシミュレーションによって知ることができることが明らかになったことは、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. センシングナノカプセルの開発 (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, 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.*, 2005 (in press)

2) Suzuki T, Hayashi S, Miki Y, Ono K, Nakamura Y, Moriya T, Sugawara A, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human breast carcinoma: a possible modulator of estrogenic actions. *Cancer Research* (in press)

- 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) De La Cruz C, Moriya T, Endoh M, Watanabe W, Takeyama J, Ming Y, Oguma M, Sakamoto K, Suzuki T, Hirakawa H, Orita O, Ohuchi N, Sasano H. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. Clinicopathological and immunohistochemical study. *Pathol Int*, 54: 90-96, 2004
- 10) 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
- 11) Ishida T, Moriya T, Furuta A, Ohuchi N. 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
- 12) 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 (tlmic) of the breast: the

- clinicalpathologic profile and immunohistochemical features of 28 cases. *Pathol Int*, 53 (7): 422-428, 2003.
- 13) Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer. *Biomed Pharmacother*, 57 (10) , 460-462, 2003
- 14) Suzuki T, Miki Y, Nakata T, Shiotsu Y, Akinaga S, Inoue K, Ishida T, Kimura M, Moriya T, Sasano H, Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma. *J Steroid Biochem. Mol Biol.* 86 (3-5), 449-454, 2003
- 15) 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*, 48: 130-137, 2003
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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
- 19) 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10日
- 20) 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、1 (2): 101-105, 2003
2. 学会発表
(国際会議)
- 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-Her 2 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

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

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

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 2005-42634 号

(国外特許)

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：PC-9040

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：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

新規ナノサイズ・センシングカプセル創製による新たな診断治療薬の開発を目指し、蛍光検出によるセンチネルリンパ節生検における最適なナノ粒子の粒径・蛍光波長を検討し、明らかにした。さらに蛍光ナノ粒子にシリカコーティングをほどこし、量子ドットと共に有用性を検討した。量子ドットは従来のポリスチレン製蛍光ビーズに比べて高いセンチネルリンパ節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なった。さらに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は、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。今後実用化を目指し、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う必要がある。

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取り除く技術の確立を目的とする。近年がん手術において従来のようなリンパ節郭清（がん細胞が転移しうる範囲のリンパ節を切除すること）を行わずに転移を

最初に起こしうるリンパ節（センチネルリンパ節）を探し当て、これを病理検査することで郭清が必要かどうかを決定し、センチネルリンパ節に転移がない場合、リンパ節郭清を省略することで患者に対する手術を最小限にとどめる方法が拡がりつつある。センチネルリンパ節を探し当て、病理検査する方法をセンチネルリンパ節生検と呼ぶが、現在主に使われるRI法と色素法にはそれぞれ欠点がある。筆者らはナノサイズ・センシングカプセルをセンチネルリンパ節生検に応用する

べく、蛍光ナノ粒子を利用したセンチネルリンパ節蛍光検出法の開発を目指した。このなかで最適なナノ粒子の条件を検討し、分担研究者の小林正と共同で装置開発を行った。また分担研究者である粕谷・小林芳と共同で安全性確保のためシリカコーティングナノサイズ蛍光ビーズを作製し、量子ドットについてセンチネルリンパ節検出の可能性についても検討を行なった。

X線造影剤はがん診断を始め、医療の診断技術の中でもきわめて重要な位置を占め、頻繁に使用される。しかし現在使用される造影剤は2-3%の症例にアレルギーを起こすことが問題となっている。我々はアレルギーのない新しいX線造影剤の開発を目指し、シリカコーティング AgI ナノカプセルを新規に開発し、X線造影剤としての有用性を、動物をモデルとした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. ナノサイズ蛍光ビーズを用いた最適な条件の決定試験（武田、石田、小林正）：センチネルリンパ節生検に最適な粒子の条件を、最も重要と考えられる、粒径、蛍光波長に絞り、ポリスチレン蛍光ビーズを用いて検討を行う。また、Cd/Se量子ドットについてその有用性について検討を行う。
2. X線造影剤の開発（武田、粕谷、小林芳、石田、佐竹）：粕谷、小林芳男らが

作製したヨード内包ナノサイズ・センシングカプセルを用い、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行う。

3. 新規ナノサイズ蛍光ビーズを用いた有用性・安全性試験（（武田、粕谷、小林芳、石田、佐竹））：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センチネルリンパ節生検についても検討を開始し、臨床への応用を目指す。蛍光ナノビーズに関してはOECD基準に基づいた安全性試験も行なう。

4. センチネルリンパ節生検用高感度蛍光検出装置ならびに鏡視下手術用蛍光画像装置の開発（武田、小林正）：分担研究者である小林正樹と共同で、蛍光ナノビーズの蛍光特性を評価し、動物をモデルとした蛍光計測に必要な装置を試作し、実験に供する。さらに鏡視下手術用蛍光画像装置を試作し、臨床応用に向けた研究を行う。

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最適な条件の

決定試験（武田、石田、小林正）：最初にいくつかの異なるサイズ、蛍光波長を持つナノサイズポリスチレン蛍光ビーズを用い、ラットに対して鼠径部のセンチネルリンパ節イメージングを行い、粒径・蛍光波長ともっとも重要な因子について最適な条件を検討した。その結果、最適なサイズは直径40nm、蛍光波長は近赤域であることが明らかになった（Cancer Sci, 2005, in press）。また、蛍光色素法は従来行われている色素法に比べてセンチネルリンパ節検出率が高いことが明らかになった。

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。ラット、ウサギを用いた動物モデルおよび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た。その結果、ナノサイズシリカコーティングAgIビーズはX線造影効果を持ち、造影剤として利用可能であることが明らかになった。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第63回癌学会総会で報告した。また特許出願を行なった（X線造影剤及び造影方法 特願2005-42634号）。

3. 新規ナノサイズ蛍光ビーズを用いた有用性・安全性試験：この結果を元に、蛍光波長720nmおよび755nm、さらに800nmの市販蛍光ビーズを用い、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。またCd/Se量子ドットについても有用性の検討を行った。その結果、Cd/Se量子ドットは従来の蛍光色素を含むポリスチレンビーズに比べて有意にセンチネルリンパ節検出率が高いことがわかった。

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週間の観察期間で急性・亜急性毒性は認められなかった。

4. センチネルリンパ節生検用高感度蛍光検出装置ならびに鏡視下手術用蛍光画像装置の開発（小林正、武田ら）：超高感度蛍光画像計測装置を作製し、蛍光ビーズの最適な条件を検討すると共に、新たに作製したシリカコーティング蛍光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寿命延長が得られることが明らかになった

（Colloids and Surfaces A, 2004）。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組み込み、中・大型動物をモデルとした新規蛍光センチネルリンパ節イメージングを試みている。この装置により腫瘍細胞移植マウス体表からの生体極微弱発行計測に成功している

（Cancer Sci, 2004）。蛍光計測法によるセンチネルリンパ節生検法に関し、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試作し、臨床応用

を目指した検討も開始した。ウサギ・ブタ体表から生体内に投与した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等の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最適な条件の決定試験（武田、石田、小林正）：本研究により、センチネルリンパ節生検において蛍光検出法が有用であることが強く示唆された。最適な条件が明らかにされた意義はきわめて大きいと考えられる。しかし現在の所、深部方向の検出限界はおよそ 1cm である。ヒトのセンチネルリンパ節検出においては 2 - 3cm の深さまでの検出能は必要であり、光・超音波相互作用の利用など、さらに新しい技術開発が必要である。

2. X線造影剤の開発：ウサギを用いたCT動物実験での造影に成功しているが、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。また排泄性が悪い場合、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、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。

4. センチネルリンパ節生検用高感度蛍光検出装置ならびに鏡視下手術用蛍光画像装置の開発（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