

elevated ( $p < 0.05$ ) on day 1 after PHx but had returned to normal by day 14. Morphological examination of histological sections revealed that the number of hepatic arteries per portal tract was significantly lower ( $p < 0.05$ ) on day 1 after PHx but had returned to normal by day 7. The velocity of RBC ( $RBC_{vel}$ ) in the THV but especially in the sinusoids was significantly elevated on day 1 after PHx ( $p < 0.05$ ). In control animals, L-NAME caused a profound reduction in  $RBC_{vel}$  in the sinusoids. The microhaemodynamics (lobular and sinusoidal perfusion, sinusoidal diameter, hepatic cord width, sinusoidal  $RBC_{vel}$ ) in the eNOS and iNOS knockout mice would appear to be not significant from those in the wild-type animals.

#### Conclusions

Our results show blood flow in the hepatic microcirculation is profoundly affected by NOS blockade showing that NO is involved in the control of vascular tone in the liver. Nonetheless, deletion of the eNOS or iNOS gene is without a major impact indicating that other dilator system takes over the role played by NO under such circumstances. During regeneration following PHx, profound but transitory changes to the microvasculature in the liver are observed including reduced vessel density and increased RBC velocity. The involvement of the NO in these changes is currently being investigated.

#### References

1. Carnovale CE, Scapini C, Alvarez ML, Favre C, Monti J, Carrillo MC. Nitric oxide release and enhancement of lipid peroxidation in regenerating rat liver. *Journal of Hepatology*. 2000;32:798-804.
2. Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunological Reviews*. 2000;174:160-71.
3. Dröge W. *Physiol Rev*. 2002;82:47-95.
4. Fausto N. *Journal of Hepatology*. 2000;32:19-31.
5. Guerrieri F, Vendemiale G, Grattagliano I, Cocco T, Pellicchia G, Altomare E. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26:34-41.
6. Nishihira T, Tanaka J, Nishikawa K, Jikko A, Taki Y, Morimoto T, Koizumi K, Kamiyama Y, Ozawa K, Tobe T. *Hepatology*. 1986;6:220-4.
7. Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, Liew FY, Zaragoza C, Lowenstein C, Diehl AM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:13829-34.
8. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW. *Nitric Oxide*. 2001;5:453-64.
9. Sun CK, Zhang XY, Zimmermann A, Davis G, Wheatley AM. *Transplantation*. 2001;72:1625-31.
10. Tawadrous MN, Zhang XY, Wheatley AM. *Microvascular Research*. 2001;62:355-65.
11. Wang HH, Lauth WW. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*. 1998;76:1072-9.
12. Zhang X-Y, Francis RJ, Sun C-K, Wheatley AM. *Journal of Surgical Research*. 2002;102:63-70.

Study supported by a grant from the Japanese Human Sciences Foundation

## 1. ナノテクノロジーの生物・医療分野への展開

### 1-1. ナノ粒子による機能分子のデリバリーシステムと解析

司会 山本健二 国立国際医療センター研

ナノサイズの薬剤伝達システムの開発は、大学、国立の研究所、企業の研究所など様々な場所で研究されており、また我が国のみならず米合衆国、英国、EU 諸国をはじめ世界中で研究されている。薬剤伝達の目的を達するには、血管内の安定性や評定細胞に効率良く取り込まれる等様々な要求を満たさなければならない。治療目的で、ナノ材料を用いるなら、その粒子の大きさは、血管から外に出なければならないことから、50nm 以下でなければ有効な結果は得られない。効率性のもう一つの要因はコアナノ粒子の表面に対する加工法である。本日のフォーラムで各研究者は目的にあったナノ粒子の巧妙な表面加工と、その驚くべき結果を照会して下さるだろう。

我々の研究は、癌を治療することを対象とした薬剤伝達だけではなく、効率の良い遺伝子導入法、抗生物質の新しい治療法さらに診断分野にも極めて有効で発展できる技術である。

### 1.1.1 ウイルスタンパク質ナノ粒子を用いたピンポイント DDS

近藤 昭彦

神戸大学・工学部・応用化学科

遺伝子治療は、癌などの難治療性疾患における有望な治療法として期待されている。このため、各種のウイルスを利用した遺伝子治療用ベクターが開発され、その有効性が示されているものの、患部近傍の正常な細胞にも非特異的に遺伝子が導入されることにより、思わぬ副作用が起こることが問題となっている。また、ウイルスに由来する DNA が持ち込まれる可能性があることは、より重大な安全上の問題である。こうした点を解決するために、本研究では、ウイルスの感染効率に着目して、ウイルスの表面抗原からなるタンパク質中空ナノ粒子を、遺伝子や薬剤をピンポイントで効率よく導入するナノサイズカプセルとして利用することとした。ここでは、ヒト肝臓に特異的な B 型肝炎ウイルス (HEV) の表面抗原である L タンパク質 (pre-S1 ペプチド+pre-S2 ペプチド+S タンパク質) を酵母細胞に発現させて得られるナノ粒子を用いる。酵母で S タンパク質を発現させて作られる粒子は、以前より HB ワクチンとして利用されてきており、その安全性が示されてきている。酵母で作られるナノ粒子がウイルス DNA を含まない安全な中空粒子である点は、極めて重要なポイントである。また、pre-S1 領域には、肝臓への感染に不可欠なレセプターがコードされていることが、最近明らかにされている。

L タンパク質を酵母で発現させた場合、可溶性タンパク質の 42% 程度まで生産できる。この酵母を破碎して、超遠心分離を繰り返すことで、L タンパク質ナノ粒子を得ることができる。この精製された L 粒子を AFM 等によって観察すると、粒子径は 50-500 nm 程度であり、約 110 個程度の L タンパク質から形成されていることが分かった。また L タンパク質ナノ粒子を、導入する遺伝子 (ここでは、グラグ緑色蛍光タンパク質 GFP の動物細胞発現用ベクター) と混ぜてエレクトロポレーションすると、遺伝子を封入した粒子を調製することができる。この遺伝子封入粒子を、ヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 の培養液に加えて 2 日間培養すると、GFP 由来の強い蛍光が細胞に観察された。一方、対照用のヒト以外の肝細胞では導入が見られなかった。そこで、次に GFP 遺伝子導入粒子を、ヒト肝臓癌由来細胞 HuH-7 および大腸癌由来細胞 (WiDr:対照) を移植した担癌ヌードマウスとヌードラットに投与した。粒子の投与はその到達能力を調べるために、尾静脈から行った。投与後 2 週間、腫瘍を切除して組織内の蛍光を観察すると、HuH-7 細胞のみで特異的に GFP が発現していた。この結果は HBV 由来の L タンパク質ナノ粒子が肝臓特異的な遺伝子導入に有効であることを示している。さらに、現在、pre-S1 領域の一部を抗体や各種のリガンドに置き換えることで、特異性を変換した各種ナノ粒子を作製して、各種細胞への標的化を行うことを検討している。抗原性の問題等、解決すべき点が多いが、タンパク質ナノ粒子は、ピンポイント DDS の有力な手法の一つに発展するものと期待される。

## 1-1-2 遺伝子導入ベクターとしての高分子ナノ粒子

斯波真理子

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部

### 研究概要

我々はポリイオンコンプレックスミセル型遺伝子治療用ベクターの開発を行っている。ポリリジン(PLL)とポリエチレングリコール(PEG)との共重合体は、DNA と会合し粒径 100nm 以下のナノ微粒子を形成する。我々はこのナノ微粒子がマウス血流中で安定に存在する条件を見出し、遺伝子導入ベクターとして *in vitro* および *in vivo* で有用であることを示した。

### 研究目的

遺伝子導入ベクターとしてウィルスベクターが広く用いられているのは、ウィルスがその外殻によって内包する遺伝子を外部環境から隔絶していること、内包する遺伝子を効率よく折り畳み、非常に小さなサイズにすること、細胞内移行がスムーズに行われることなどの性質を持っているからである。しかし、近年のウィルスベクターに対する安全性に関する懸念から、ポリマーを用いたベクターの開発が注目されるようになってきた。ポリマーベクターはウィルスベクターに比し、安全性、免疫原性、多量に化学合成できることなどの面で利点を有するが、発現効率が充分でないと言われている。我々は、循環器疾患に対する遺伝子治療を目的とし、安全で効率の良い遺伝子導入ベクターの開発を行っている。

### 研究成果

ナノ微粒子のターンオーバースタディより、PLLの長さは、19 マーと 48 マーでは 48 マーのものが血中安定性が高く、DNA と PLL のチャージ比率は 1 : 4? 1 : 8 のものが 1 : 1? 1 : 2 のものより安定であることがわかった。*in vitro* における遺伝子発現を HepG2 細胞を用いて行った。遺伝子発現効率は、チャージ比率が 1 : 2? 1 : 4 のもので最大であった。フリーのポリマーとの *preincubation* により遺伝子発現効率が低下したことより、PIC ミセルによる遺伝子導入は、カチオン性ポリマーの静電相互作用によりおこるものであることが示唆された。*in vivo* における PIC ミセルの遺伝子発現をマウスを用いて検討した。CMV-Control を用い、チャージ比率が 1 : 0? 1 : 6 の PIC ミセルを上腸間膜静脈から投与したところ、1 : 4 のもので肝臓に著明な活性を認めた。その他の臓器においては有為な活性の上昇を認めなかった。以上より、PIC ミセルは遺伝子導入ベクターとして *in vitro* および *in vivo* で有用であることが示唆された。

### 1-1-3 半導体ナノ粒子の医・生物学応用

<sup>1,2</sup>花木 賢一、<sup>1</sup>山本 健二

<sup>1</sup> 国立国際医療センター研究所、<sup>2</sup> 日本学術振興会科学技術特別研究員

半導体ナノ粒子はナノマテリアルとしては最も単純な構造物の一つであり、最も精力的に研究が行われているものはセレン化カドミウムを核 (core)、硫化亜鉛を殻 (shell) とするナノ粒子 (quantum dots, QDs) である。QDs の特筆すべき特徴は、核の粒径を制御することによって青から赤の可視蛍光、および近赤外・赤外域までの発光体となることである。そして、フルオレセインやローダミンといった既存の有機系色素に比べて、高い光量と耐光性、広い励起光選択性と狭い発光スペクトルという優れた特性を有している。QDs はそれ自身疎水性化合物であるが、1998 年に有機酸により親水化した QDs が報告されて以降、生物学への応用の期待が高まった。しかし、低い耐塩性による易凝集性のために実用には至らなかった。

血清アルブミンは脂肪酸やビリルビンといった不溶性物質と結合してそれらを運搬する働きを有するが、有機酸により親水化した QDs の分散媒となりうることを期待された。そこで、様々な動物種由来のアルブミンによる 11-メルカプトウンデカン酸により親水化した QDs のリン酸バッファー (PBS)、細胞培地 (DMEM) 中での分散性を比較検討した。その結果、ヒツジ由来の血清アルブミン (SSA) が最も分散媒として優れていた。QD/SSA 複合体を Vero 細胞へ取り込ませると、エンドソームで蓄積され、エンドソームマーカーとして用いられているフルオレセイン標識デキストランに比べて長時間保持された。エンドソーム内の QDs はフルオレセインに比べて光量で 1.6 倍、耐光性で 30 倍優れており、QD/SSA 複合体は新しいエンドソームマーカーとしての応用が考えられる。

実用に耐えうる親水化 QDs は昨年末にアメリカのベンチャー企業より発表され、蛍光色素としての生物学研究への応用が現実なものとなってきた。特に QDs は広い励起光選択性と狭い発光スペクトルにより、単一励起光による多色同時発色が可能であり、免疫多重染色をはじめとする多色解析への応用が考えられている。しかし、有機系色素では考えられなかった欠点：発光スペクトルのブルーシフトとレッドシフト等が明らかになっており、それらの克服が生物学研究材料として QDs が普及するための今後の課題といえる。

QDs の医学応用として、薬物送達システム (drug delivery system, DDS) が考えられている。QDs は SH 基を有する化合物を粒子表面に結合させることが容易であり、合成ペプチド等と薬剤とを QDs へ同時に付加することで、薬物の DDS とトレーシングとを同時に行うことが可能になると期待される。

## 1-1-4 高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー

片岡一則  
 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻

### 1. はじめに

最近、様々な分野で、原子・分子のサイズや精度でものを加工 (processing) し、組み立て (assembly)、高次な機能を持つユニットを形成する技術 (ナノテクノロジー) が注目されている。とりわけ、医薬品医療の分野においては、薬物の体内分布を時間的・空間的に正確に制御する事によって、「必要な時 (timing) に、必要な部位 (location) で、必要な

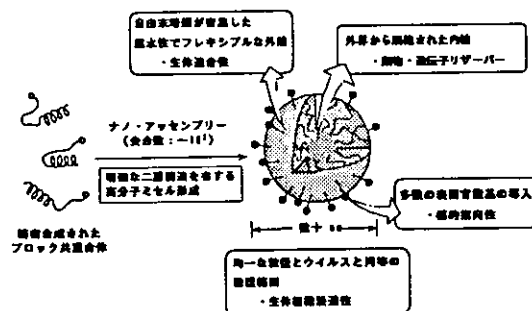


図1 薬物・遺伝子デリバリーのための高分子ミセル設計

薬物治療 (action)」を最小限の副作用で達成する高精度ターゲティング治療に対する関心が高まっているが、この目的を首尾良く達成する為には、ナノスケールで精密設計された高機能化薬物運搬体 (ドラッグキャリア) の開発が最重要とも言える課題である。特に、遺伝子治療との関連では、副作用や危険性が指摘されているウイルスベクターに取って代わる合成ベクターの開発競争が米国をはじめとする各国のベンチャー企業や大学を中心に過熱状態の様相を呈しつつある。本講演では、精密合成された高分子鎖のアセンブリーに基づいて形成されるナノ構造体 (高分子ミセル; 図1参照) を薬物や遺伝子のキャリアとして用いる演者らのアプローチを紹介し、そのナノ医療システムとしての展望を討論したいと考えている<sup>1-9)</sup>。

### 文献

1. A. Harada, K. Kataoka, *Science* 283, 65-67 (1999)
2. 片岡一則, *DDS* 15, 421-428 (2000)
3. K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 113-131 (2001)
4. H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Materials Today* 4, 30-36 (2001)
5. N. Nishiyama, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, *Pharm. Res.* 18, 1035-1041 (2001)
6. Y. Kakizawa, K. Kataoka, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 203-222 (2002)
7. M. Harada-Shiba, K. Yamauchi, A. Harada, K. Shimokado, K. Kataoka, *Gene Therapy*, 9, 407-414 (2002).
8. N. Nishiyama, H. R. Stapert, G.-D. Zhang, D. Takasu, D.-L. Jiang, T. Nagano, T. Aida, K. Kataoka, *Bioconjugate Chemistry* 14, 58-66 (2003)
9. E. Jule, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Bioconjugate Chemistry* 14, 177-186 (2003)

## 1-2. 生体機能解析のためのナノプローブ開発

司会 中西 守、平嶋 尚英

名古屋市大・院薬

ナノテクノロジーの生物・医療分野への展開における重要な課題の一つは生体機能解析のためのナノプローブ開発である。本セッションでは、この分野のわが国の研究を先導する若手・中堅の研究者にご自身の最先端の成果を報告していただくようご講演をお願いした。それぞれの先生方のご研究が医療に直接結びつくにはまだ若干の時間が要するとも考えられるが、ご紹介いただく研究成果は基礎研究から臨床応用まで医療の様々な分野に適用できるものであり、このようなプローブのニーズの高さを考えあわせれば、これらの成果が近い将来広汎に利用されるものと期待される。

### 1-2-1 新規ナノプローブの開発と1分子イメージング：細胞の情報伝達と機能解析

船津高志（早稲田大・理工）

### 1-2-2 モノクローナル抗体の生細胞導入のための新しい技術の開発

新井孝夫（東京理科大・理工）、大内 敬（東京理科大・理工）

### 1-2-3 多機能化を目指した複合微粒子マグネット・リボソームの開発

松村英夫（産総研）

## 1-2-1 新規ナノプローブの開発と1分子イメージング：細胞の情報伝達と機能解析

○船津高志、多田隈尚史、東條正  
早稲田大学 理工学部 物理学科

1分子蛍光イメージング法を用いて、細胞内の情報伝達にかかわるmRNAの輸送と、細胞膜上でのリセプターの状態を解析した。

### 1. 生きた細胞の核内 mRNA の1分子蛍光イメージング

mRNAの核から細胞質への輸送は、真核生物の遺伝子発現において必要不可欠な重要な過程である。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多い。これを明らかにするために、蛍光標識したmRNA1分子の核内運動を観察した。運動を観察するためのモデルmRNAとして、ヒトβグロビン部分遺伝子のmRNA(5'cap構造、エキソン、3'polyA配列を持つ405塩基)をin vitro転写系で合成し、グアニン残基に平均5~10個の蛍光色素Cy3を共有結合させた。これを細胞の核内にマイクロインジェクションにより導入し、共焦点顕微鏡を用いてビデオレートで観察した。個々のmRNAを観察すると動いているmRNAと止まっているmRNAが存在し、両者の割合はほぼ同じであることがわかった。次に、止まっていたmRNAが動き出すまでの時間をヒストグラムにして解析した結果、平均30秒の指数関数分布になった。動いているmRNAについて解析したところ、平均二乗変位は時間に対して比例することがわかった。このことからmRNAの運動がブラウン運動であることが明らかとなった。みかけの拡散定数は $0.4 \text{ m}^2/\text{s}$ であり、純水中の拡散定数の1/100であった。以上の結果は、mRNAが核内構造物とダイナミックな結合・解離を繰り返しながら核膜孔へ拡散により輸送されることを示唆している。

### 2. 生細胞におけるGタンパク質共役受容体の1分子蛍光イメージング

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は生体の恒常性維持に欠かせない役割を果たしている。最近、分子生物学的生化学的解析の結果から、Gタンパク質共役型受容体が多量体を形成しているとの報告がなされつつある。多量体形成がGタンパク質共役型受容体のシグナリングにどのように関与するのかを明らかにすることは、新薬開発や病態解明に寄与すると期待される。Gタンパク質共役型受容体の一つであるFPR1(フォルミルペプチド受容体)と蛍光タンパク質・EGFPのキメラをCHO細胞に発現させ、1分子蛍光イメージング法により、FPR1の多量体形成を観察した。蛍光強度分布から、FPR1-EGFPはリガンド非存在下であるにも関わらず、2~4量体を中心とする多量体を形成していることが示された。また、十分な量のリガンドを投与すると、時間依存的にFPR1-EGFPは細胞膜のいたる所に凝集し側方拡散が止まることが確認された。この実験結果はFPR1はリガンド非存在下で既に多量体を形成しており、リガンド結合はFPR1多量体形成に関与しないことを示唆している。



## 1-2-2 モノクローナル抗体の生細胞導入のための新しい技術の開発

○大内 敬、新井 孝夫  
東京理科大学・理工学部・応用生物科学科

生きている細胞中の生体分子を、中和抗体による機能阻害や、抗体を用いたイメージングにより解析する場合、抗原が細胞表面分子であるならば細胞を培養している培地中に抗体を添加すればよい。しかし、細胞の内部と外界を隔てる細胞膜は特殊な場合を除きタンパク質のような異物を通過させないので、抗体を細胞膜内に存在する生体分子に作用させるためには特殊な方法を用いて生細胞内に導入する必要がある。多くの研究において、これらの操作にはマイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法が用いられてきたが、前者は特殊な設備や実験者の熟練を必要とし、また多数の細胞に導入することは難しい。更に、卵母細胞のような大きな細胞では比較的容易だが、薄く小さな細胞に適用することは困難である。後者は細胞傷害性が高く、また使用できる対象が限定されてしまうという問題がある。そこで我々は、細胞膜の主要構成成分が脂質であり、通常負に帯電していることに着目し、正の電荷を持ちかつタンパク質と複合体を形成できるような脂質分子を用いれば容易に生細胞内に抗体を導入できると考え、カチオン性脂質を用いたモノクローナル抗体の生細胞導入法を開発した。この方法は、一度の処理で多数の細胞に抗体を導入でき、しかも抗体をカチオン性脂質溶液と混合し培養細胞に添加するだけでよいため、96 ウェルプレートを含む様々な培養機器中で生育された細胞に導入することが可能である。次に、本方法を用いて、生細胞内生体分子の可視化、及び細胞内タンパク質の機能阻害を試みた。蛍光色素標識抗 GFAP (グリア繊維性酸性タンパク質) モノクローナル抗体をラット胎児脳由来のアストログリア細胞に導入し、生細胞内分子の可視化を試みたところ、生きているアストログリア細胞内の GFAP が構築する繊維状の細胞骨格像を蛍光顕微鏡下で観察することができた。続いて、マイクロインジェクション法でウニ卵に導入した場合その卵割を阻害することが報告されている抗チューブリン抗体 D2D6 を、ラット繊維芽細胞株である 3Y1 細胞に導入し、増殖に対する影響を調べた。比較として D2D6 と同じ IgG1 であり、機能阻害能のない抗チューブリン抗体である B1 も実験に用いた。その結果、D2D6 を導入した細胞のみの増殖が妨げられた。この阻害は、精製抗体だけでなく、腹水や抗体産生細胞の培養上清を使用しても見られた。これらの結果は、カチオン性脂質法を用いれば、抗体を用いた生細胞内分子の可視化を簡便に行うことができ、また中和抗体などを導入して細胞内分子の機能を阻害することにより、その分子の機能を解析する実験法にも適用できる可能性を示唆している。

### 1-2-3 多機能化を目指した複合微粒子マグネット・リボソームの開発

松村 英夫

産業技術総合研究所 光技術研究部門およびライフエレクトロニクス研究ラボ  
(hideo-matsumura@aist.go.jp)

微粒子を医学・医療へ利用する試みはたくさん行われているが、最近、ナノテクノロジーなどの先進技術とリンクして研究が益々盛んになっているようである。微粒子はその構成材料に対応する物理・化学的特性(機能)をもつ。例えば、半導体ナノ微粒子や蛍光色素を含むラテックスは蛍光、磁気微粒子は磁性、リボソーム粒子は水溶性分子のキャリアー、エマルジョン粒子は油性分子のキャリアー等である。一方、医学・医療側からは医学・薬学・医工学的機能が必要とされる。例えば、センサー機能、イメージ増感機能、薬物輸送機能、生体成分分離機能、治療補助機能等が考えられる。われわれは単独では機能が限られる微粒子をそれぞれ組み合わせることにより、複数の機能をもつより便利な複合微粒子を開発し医学・医療への応用展開を目指している。

ここでは、一例として、リボソーム微粒子(薬物キャリアー能)と磁気微粒子(磁性で存在場所がコントロール可能)との複合微粒子: マグネット・リボソームの開発について紹介する。このマグネット・リボソームは中心に磁気微粒子を、周囲に脂質の二分子膜微粒子であるリボソームを配置したものである。医療応用の一例として、エレクトロケモセラピーへの適用が考えられる。エレクトロケモセラピーはハルス電場のアシストで抗癌剤等薬物を患部細胞へ投与する手法である。このとき、薬剤を内包するマグネット・リボソームを用いれば勾配磁場により薬物投与の場所限定ができ、リボソームから放出される薬物をその場で無駄なく細胞へ導入することで、薬物投与効率の改善や副作用の低減をはたせられると予想される。

磁気微粒子としては超常磁性微粒子のヘマタイト系を中心に開発している。表面に合成シリカ層をもち静電的反発力で単粒子分散性の良いヘマタイト(粒径: 数百nm-1 $\mu$ m)を用いた。ヘマタイトは磁氣的相互作用が弱く自己凝集が少なく、外的磁場がかからない限り単粒子として水中に分散する。われわれの磁気微粒子は磁気泳動速度係数として約0.01(cm/s)(T/cm)程度のものである。Tは磁場強度テスラ。勾配磁場を用いれば磁場強度の大きい所へ集めることが出来る。

リボソーム粒子はリン脂質を主成分とした二分子膜微粒子の数十nm-数百nmを中心に開発している。電場によるリボソームからの物質流出については、交流矩形波を用い、電場強度、印加時間、周波数等について調べている。

粒子複合化はヘテロ凝集法やタンパク質を架橋分子としたブリッジング法を用いている。タンパク質は種々の表面に物理吸着しその過程は多くの場合不可逆吸着であることから架橋分子として適する。複合化のプロセス確認には粒子の表面電位(ゼータ電位測定)、光学顕微鏡、X線顕微鏡で行っている。講演ではこれらの概略について説明したい。

## 2 バイオナノテクノロジーによる産業創出にむけて

### パネルディスカッション

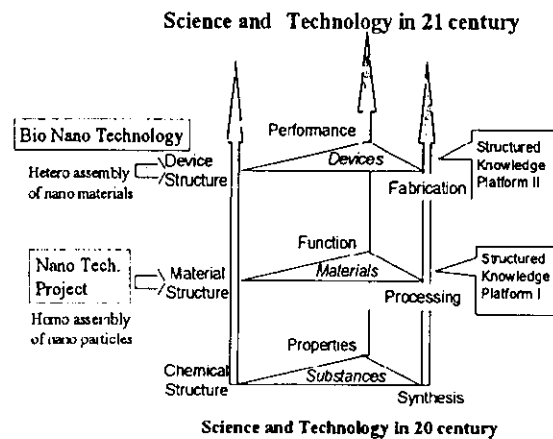
司会： 阿尻雅文  
東北大学多元物質科学研究所

最近の10年間で、新材料の開発の方向性が急激に変わりつつある。20世紀は、コモディティケミカルズを大量に合成する時代であった。しかし、先進諸国では、すでには、化学製品の対象が、スペシャルティケミカルズ、構造化材料、そしてデバイスへと移っている。製品の対象も、電子材料、環境材料、健康・医療分野を多岐に渡っている。一方、最近のナノテクノロジーブームも材料研究開発の変化に拍車を掛けている。安全な物質を用いつつ、ナノ材料のサイズ、形状、高次構造を制御した構造化材料を創ることで新たな機能発現を期待できる。

ナノ粒子プロジェクト(プロジェクトリーダー奥山、2001-2006)では、ナノ粒子を高速に配列コーティングする技術も開発されている。産業が今求めている製品開発のターゲットは構造化材料であることを考えれば、次に開発すべきナノテクの技術ステージが、設計通りに、配列しデバイス化していく技術であることは明らかである。

バイオナノテクノロジーは、DNAやタンパクのアセンブリ機能を用いることで、設計通りにナノ材料を配列(ヘテロアセンブリ)し、デバイス化させる技術であり、設計と通りにナノ材料を配列、構造化できる可能性を有している。多様なバイオ分子をナノブロックとして把らえ、ナノブロックを高度にアセンブル、デアセンブルを制御する技術は、多成分系の高次構造化材料を創りだしていくための「鍵」となる技術となろう。近年、バイオナノテクに関連する基礎科学・技術について研究報告もでている。しかし、様々な利用を視野に、産業化に直結するバイオナノテクノロジーの開発が必要である。産業において、求められるのは、高速に、大量に、大きなスケールで製造するための技術であり、そこには化学工学的的方法論の導入が必須である。

このようなバイオナノテクノロジーを新規産業の技術基盤化していくためには、新領域の「知識の構造化」と技術のプラットフォーム化が必要である。プロセスと構造、構造と機能の関連を明らかにする必要がある。その目的のために、ナノバイオに関する知識を構造化していく必要がある。産業基盤となるためには、それが使える形になっている必要があり、例えば新たな機能を発現させるために、必要なナノバイオブロック、そしてその構造化のためのプロセスを推薦するようなものである必要がある。また、構造や機能を設計し、プロセスを設計できるためのエンジンを備えている必要もある。また新たな発見や発想を支援するためのナノバイオインフォーマティクスを創っていく必要がある。



## 2-1 バイオナノテクノロジーの世界の動向

安田英典  
(株)三菱総合研究所安全科学研究本部

### 概要

#### 米国

NSFはCornell Universityにファンディングを行ない、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの境界分野を研究するCOEとして、NANOBIOTECHNOLOGY CENTER (NBTC) を設立した。NBTCの目標は以下のとおり。

- ・ナノバイオテクノロジーを用いて全く新規のミクロスケール、ナノスケールのデバイスとシステムの設計を可能にする。
- ・生物由来の物質のシステムを使用するために新規の製造プロセスを開発する。
- ・分子スケールでの効率的な計測機能によって、科学的な理解とデバイス製造法に対して新しい世界を開く。

#### 英国

バイオナノテクノロジー分野の Interdisciplinary Research Center(IRC)が設立された。IRC は Oxford University, the Universities of Glasgow, Yorkおよび, the National Institute for Medical Researchで構成されている。

研究の目的は、生物の構造と機能を理解して、科学とエンジニアリングを推進するための自然のソリューションとして利用することである。期待される自然のソリューションの利用例としては、酵素や蛋白が分子を厳密に制御してアセンブリーすることから、ナノテクノロジーのアイデアを得ること等が挙げられる。

#### ドイツ

マックスプランク協会は次のようにバイオナノテクノロジーをコメントしている。

バイオナノテクノロジーは将来のドイツ経済の活力を構成する要素であり、COE にファンディングすることが適切な方策である。また、多くの分野に跨る研究所群を要していることはナノテクノロジーとバイオテクノロジーの境界分野の開拓には有利である。

## 2-2 DNA 操作技術と健康医療・IT 産業技術としての展開

桂 進司  
豊橋技術科学大学エコロジー工学系

近年の蛍光を用いた生体高分子の観測技術の進展に伴い、DNAを初めとする生体高分子の挙動を1分子レベルで観測することが可能になってきている。このような1分子レベルの解析を効率的に行うためには、マイクロマニピュレーション技術により観測対象となる分子を顕微鏡視野内の適当な位置に操作する必要があるため、生体高分子を対象としたマイクロマニピュレーション技術の開発が強く求められている。また、1分子DNAを対象とした操作技術を染色体DNA分子に適用することにより、特定の遺伝子配列の染色体DNA上の位置を決定することや、DNAの切断技術と組み合わせることにより観測した領域のDNA断片を調製することが可能になると期待されている。このような技術が可能になれば、従来のゲノム解析技術を革新すると考えられ、その観点からもDNA分子のマニピュレーション技術の開発が望まれている。

DNA 1分子の操作技術をゲノム解析、ライフサイエンスなどの様々な分野に応用するためには、巨大な染色体DNAを損傷せずに調製することが強く求められている。DNAはPEG (Polyethylene Glycol) などのアルコールや低分子カチオンの凝縮試薬を一定濃度以上にとると、ランダムコイルからグロビュール構造と呼ばれる凝縮構造に相転移を起こすことが知られている。グロビュール構造はランダムコイル構造に比べて、空間的広がりが小さいため機械的ストレスの影響を抑えられ、巨大DNA分子の水溶液中での物理的操作が可能になる。さらに、このグロビュール相転移は巨大DNAの水溶液中での物理的操作に加え、局所的な物質密度を増加させるためにレーザー光によるDNA分子のマニピュレーションを可能にした。また、この相転移は可逆的な一次相転移であるために凝縮試薬の濃度を低下させることにより、グロビュールDNAは末端からランダムコイル構造への逆相転移が生じる。このことを利用することにより巨大DNAを末端から伸張固定することが可能になった。

ここで紹介したDNAのマニピュレーション技術はゲノム解析に応用することを念頭において開発してきたが、この技術を塩基配列特異的な結合を応用することによりカーボンナノチューブ、ナノパーティクルなどの機能性素子を配列させることにも応用することが可能である。この技術を用いて機能性ナノパーティクルを高精度・高効率で配列することが可能になれば、半導体をはるかに上回る高集積で低消費エネルギーの機能回路が実現することが期待される。また、生体高分子を利用した特異的な結合は容易に解離させることができるために、各機能性素子を遊離させ、その後、もう一度、特異性を利用して機能性素子ごとに回収することも可能であり、リサイクル社会の実現にも大いに貢献すると期待される。

## 2-3 バイオナノテクノロジーのシステム設計? 生体模倣膜?

山口猛央

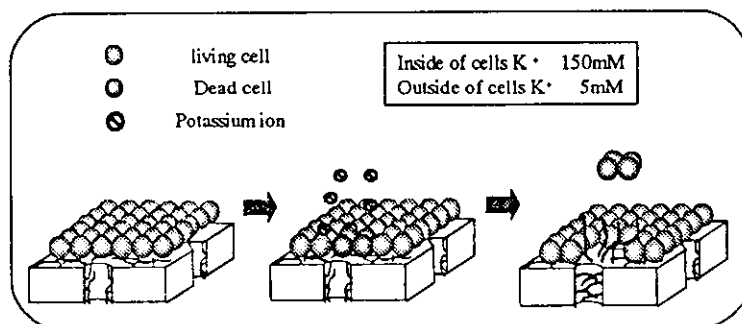
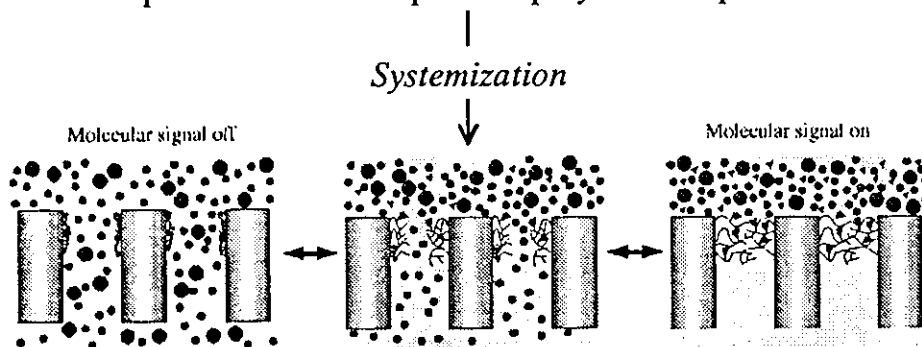
東京大学大学院工学系研究科化学システム工学専攻

従来の人工材料では分離・反応など一定の機能を定常的に示すが、生体では時間・環境によって同じ細胞や生体膜が異なる機能を示す。生体膜自身を人工的に作ることは困難だが、生体膜の持つシステムを人工材料に模倣することは可能である。特定物質シグナルを認識し、必要な機能を必要なときにだけ示すことによりシステム全体の安定性を保つ材料を構築する。未来の人工臓器、薬物送達システム、マイクロリアクタを考えると、この生体システムは見本となる。

我々は超分子による物質認識機能、環境応答ポリマーによるアクチュエータ機能を多孔体内部で協調的に組み合わせ、様々な材料システムを開発している。情報伝達物質だけを認識して膜細孔の開閉を行う分子認識ゲート膜、材料が自律的に特定物質だけを認識して捕捉し、その後自律的に離脱する分離材料などの開発に成功している。分子認識ゲート膜では、数十ナノメートルの膜細孔中に感温性ポリマーとクラウンエーテルの複合体をグラフト重合し、特定のイオンシグナルに対して速やかに細孔を開閉する膜を開発している。自律応答分離材料では、感温性ポリマーとシクロデキストリン複合体を用い、感温性ポリマーの膨潤・収縮とシクロデキストリンの錯体形成、解離を協調させ、自律的に特定分子の吸着と脱着が行われるシステムを構築している。

さらに、分子を認識すると膜細孔を自律的に開閉し透過性能を振動させる膜や、死んだ細胞から放出されるイオンシグナルを認識し、死細胞だけを選択的に系から除去する人工新陳代謝材料システムも開発している。現状では膜に関する模倣が主だが、さらに生体システムを模倣し、細胞、組織、器官へと発展させた材料システムの構築を目指している。

### Nano pores + Stimuli responsive polymer + Supramolecules



## 2-4 バイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合による新技術の創生に向けて

後藤 雅宏  
九大院工・さきがけ 21

「はじめに」 半導体をはじめとした電子材料の分野では、今やナノオーダーでの配列制御技術は、必要不可欠な最新の技術となっている。バイオテクノロジーの分野でも、最近の遺伝子技術の発展とともに、様々な分野で遺伝情報の利用が注目されている。なかでも遺伝子の異常配列を検出する DNA チップは、バイオ分野における最新のナノテクノロジーよりなり、すでに実用化の時期を迎えている。バイオテクノロジーとナノテクノロジーが融合することによって、様々な技術革新が起ると期待されている。

### 1. バイオナノコーティング

いろいろな薬物の表面を界面活性剤の分子膜で覆うことによって、特性の改質が可能となる。最も典型的な例として、水溶性の薬物をこれらの手法でナノコーティングすることによって、有機相に簡単にとける脂溶性の薬剤に変換させることが可能となる。例として、インシュリンを取り上げ、ナノコーティングの手法で調製された経口製剤の血糖値低下効果について紹介する。

### 2. 薬物送達システムにおけるナノ分子集合体の可能性

合成した糖脂質誘導体をリポソームに組み込み、*In vitro*における種々のガン細胞に対する制ガン効果を WST-Assay 法によって検討した結果、糖脂質を組み込んだリポソームが、ガン細胞の増殖を特異的に抑制することが明らかとなっている。リン脂質と界面活性剤を構成成分として開発したハイブリッド型リポソームは調製が容易であり、従来の有機溶媒を用いる逆相法に比べると有機溶媒の混入がなく、安定で医用への応用に対して魅力的な分子集合体といえる。さらに、ハイブリッド型リポソームは安全性が高いことが示唆されており、医用工学へ応用可能な材料として期待されている。

### 3. ナノ集合体を利用した変異遺伝子の検出

ナノ集合体中に種々の遺伝子を取り込ませ、ハイブリダイゼーションを行った結果、正常な遺伝子（フルマッチ）のハイブリダイゼーション速度が、他の変異遺伝子の速度に比べて非常に速いことが示された。変異が、最末端に一カ所見られる場合でも、ハイブリダイゼーション速度は抑制され（70%）、中心付近に変異がある場合、その速度は、正常遺伝子のそれに比べて10分の1以下に低下する。これより、遺伝子の配列に異常がある場合、逆ミセル中で起こる二重らせんの形成速度が著しく抑制されることが明らかとなっている。

今後、様々なナノテクノロジーが、バイオテクノロジーと融合することによって、新機能が創生されると考えられる。異分野研究者の融合が切に望まれる。

## 2-5 バイオインフォマティクスによるバイオナノ材料の開発

本多 裕之  
名古屋大学大学院工学研究科

バイオ分子は、偏差ゼロの全く均質な分子であり、そのもっとも重要な機能は、ペプチドやタンパク質の持つ分子認識機能である。これは、類似分子の多い生体内においてきわめてスペシフィックな、機能であり、通常の有機無機の化学分子では持ち得ない特異な機能である。この分子認識機能の本質に迫るため、アミノ酸配列と結合強度に関するデータベースの構築とそこからの結合ルールの抽出が期待される。ルール抽出できれば、新規ペプチド医薬の探索が可能になると考えられ、新規な機能性ペプチドの開発も道が開ける。また High throughput Screening に頼るのではなく、合理的に Object 指向的にペプチドをデザインすることが可能になると期待される。ペプチドデザインは、バイオナノテクノロジーの進むところ必ず必要になる技術でありきわめて重要である。

生体において主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) 分子群は、抗原ペプチドと結合してこれを提示することで免疫に深く関与する。免疫疾患や癌に対する治療法の開発において、抗原ペプチドと MHC の結合様式の解明は非常に重要である。しかし、MHC 分子は多様性にとみ、実験的なエピトープ同定は困難である。そこで、データベースを使って知識情報処理的な解析で結合ペプチドを予測する手法の構築が望まれている。我々はファジィニューラルネットワーク (FNN) や隠れマルコフモデル (HMM) といった知識情報処理的な手法を適応することで、高精度な結合推定モデルを構築した。特に FNN は結合に関する知識を明示的に示すことができ、1) N 末側から 1 番目の親水性、2) 6 番目の van der Waals 半径、3) 7 番目の親水性、が MHC 分子との結合に深く関与することがわかった。FNN モデルの結合ペプチドの予測精度は 84% に達した。このことは、ペプチドデザインのためのファーストスクリーニング技術としてきわめて有用である。近年ではペプチド固相合成法が進み、トリペプチドであれば 8000 ペプチドを一度に解析できるようになってきた。このデータを蓄積し、FNN や HMM といった手法に適応すれば種々のバイオ分子の設計を支援できると考えている。



## 2-6 バイオナノテクノロジーの知識の構造化に向けて

### —材料ナノテクプログラムにおける「知識の構造化」プラットフォームの紹介—

神谷秀博  
東京農工大学大学院生物システム応用科学研究科

#### 1. はじめに

2001年度からスタートした経済産業省の「ナノ材料プログラム」は、Fig.1に示したように、材質と共通機能に着目した複数のプロジェクトで構成される。この中で、各プロジェクトの成果を社会に広く活用・還元・利用を目的とした総合的な研究開発支援システム（知識の構造化）が新しい形態のプロジェクトとして加わった点に特徴がある。本論では、材料ナノテクノロジープログラムにおける知識の構造化プラットフォームの概要と現状を紹介し、バイオとナノの融合領域における「知識の構造化」について議論を進めるきっかけとなれば幸いである。

#### 2. 構築するプラットフォームの基本概念

これまでの材料研究成果に関する知識に各プロジェクトで得られた知見を共通基盤技術として集約した「知的プラットフォーム」は、過去の材料研究やナノテク関連プロジェクトの成果の単なるデータベース（DB）ではない。材料製造プロセスと機能・構造の評価・設計・制御に必要な知識を体系的に整理した体系的マップ（これをマンダラと呼んでいる）が存在し、それにDBや界面分子構造から材料のマクロ構造までの階層的シミュレーターやモデリングツール、理論やモデルの体系的電子教科書と縦横無尽にリンクができる構造になっている。このシステムのユーザーは、このプラットフォームにインターネットを経由してアクセスし、自分のテーマに必要なナノテクノロジー関連の研究、DBや特許の検索を行うとともに、自ら構想したアイデアを、電子教科書に記載された理論や各理論に連結した理論計算用ソフトやシミュレーターによる定量的計算などを使って検証できる。

最終的には材料ナノテクノロジープログラムの中の全プロジェクトに関して分野別プラットフォームを構築した上で、材料材質に拠らない材料共通の機能・構造設計概念（「軸だし」と呼んでいる）や材料開発・設計に関する発想法自体の開発も試みている。

#### 3. ナノテクとバイオテクノロジーが融合した知識の構造化に向けて

材料ナノテクノロジーの新しい展開として、バイオテクノロジーとの融合によるバイオナノテクノロジーが様々な分野で構想されている。「知識の構造化」プロジェクトの推進母体で化学工学会は、バイオナノテクノロジー委員会<sup>1</sup>を昨年結成し、この分野での知識の構造化の展開を開始している。

引用文献 1) 化学工学会バイオナノテクノロジー委員会、化学工学、66, 554-557(2002)

## 2-7 バイオナノテクノロジーの基盤化と産業創生:産業界の期待

渡邊 英一

東京大学総合研究機構 ナノマテリアセンター(化学工学会)

各国のナノテクノロジーへの科学技術予算配分は年々拡大し、ポストゲノムを中心とするバイオテクノロジーへの期待にまさるとも劣らない勢いである。一方、ナノテクノロジーとは何かということについては、その本質が一般の人に十分理解されないままブームだけが過熱しているように見える。それでは、ナノテクノロジーとは何か。一言で言えば、「原子・分子の集団のナノ領域ならではの振る舞いとそれに由来する新たな物性(機能)を物質科学(物理化学)の視点で調べるナノサイエンスと、その成果を工学的に体系化したのち産業用途を意識して確立する応用技術」と言えよう。ナノ領域は、例えば「自己組織化」という、従来とは異なる構造形成が成立する世界であり、日本語で「超微細技術」という表現から直ちに連想される微細加工技術による構造形成イメージとはほど遠い。原子・分子集団のナノ領域ならではの振る舞いは、「強相関系、非平衡・非線形、複雑系、界面機能」などで特徴付けられ、これまでにない特異的な機能の発現が期待できる。これらは、生体が通常体内で発現している分子機能のメカニズムとも重なる。見方をかえればナノテクノロジーとは生体の機能発現メカニズムを人工系に適用することだともいえる。そこで、逆に生命分子に対しナノテクノロジーを意識的に適用すると新たにバイオナノテクノロジーという魅力ある技術世界を我々は手にすることができるだろう。ではこの技術の先にある産業は、従来のバイオ産業と何が異なるのだろうか。バイオ産業が生物や生体、生命分子そのものをあるがままに「飼いならして」利用してきたのに対し、バイオナノテクノロジーでは「物理化学的原理による設計」で生命分子から人工物(システム)を製造することが最大の差異であろう。この場合に注意すべきは、生体分子(およびそのシステム)が持つ特徴と従来の人工物設計思想との相違点である。生物は、「精緻なのにリダンダンシーを持つ」「構造が一義的なのにあいまい性を持つ」「恒常性を有するのに変化する」「変化するのに安定である」「自己複製、自己修復、自己補償、自己創出性を有する」など相矛盾する性質を併せ持つ。これらは、従来の人工物設計の基本である「効率性」「合理性」「信頼性」「安定性」「制御性」などとは相容れない。したがって、バイオナノテクノロジーを真の製造技術にするためには、生命物質そのものの物理化学的相互作用、生命物質と人工物の相互作用、物理化学的諸因子や基本法則などを明らかにするとともに、工学としての体系化、さらには設計が可能な知識の構造化など、知識基盤を固めることが必要となる。産業界はアカデミアとの連携の下に、得られた知識基盤を利用して市場の要請に基づく新たな商品群を設計、提供していくことが望ましい。地道で息の長い努力により次世代の産業の芽が育ち、新たな産業形態の花が開くことを期待したい。

### 3 生体のナノフィールド動態観察—基調報告—

司会 眞島利和、○守谷哲郎

(独)産業技術総合研究所 ライフエレクトロニクス研究ラボ

生命活動を“生きたまま”計測しその情報を我々の生活や医療に有効活用することは、21世紀の科学技術に課された中心的な使命の一つである。エレクトロニクス等の進歩により生物から入手出来る情報は飛躍的にその量と範囲が増しており、既に人の遺伝情報については基本的なゲノムシーケンスの解読に成功し、タンパク質などのより高次な構造分析も加速的に実施されている。今後の課題として、活動している細胞、組織、人体などから取得された生命活動データをリアルタイム画像化や高度情報処理によって分析をより容易にし、また広範な人々の利用を実現するための研究が重要になる。

現在、生命活動を観測しそのデータをコンピュータで処理するという操作に基づいて、生物動態画像解析、医用映像技術、生体機能マッピング、エコ画像モニターなどバイオイメージング関連の多様な新技術が出て来ているが、これらは或る意味で生物系と我々が人エシステム（計測）を介してコミュニケーションを可能にしつつあると言うことも出来よう。細胞—顕微鏡—観察者、患者—医療診断機器—医者、自然—環境モニター—監視者などの組み合わせでは、計測機器は単なるインターフェースのレベルを超えて、相互に情報をフィードバックする情報交換機能（=コミュニケーション）を備えた時代になる。

こう言った生命科学の大きな流れの中で、生体計測の多様なニーズに適切に対応できる技術のプラットフォーム化が重要になると考える。生物学、生理学、医学等での個々の研究対象について高度に進歩した技術が取り入れられているが、計測技術そのものは総合科学技術であり、一つの技術が万能ということは無いのが現実である。そこで、計測技術を要素技術に細分するのではなく全体を技術プラットフォームと考えて、研究開発を均等にバランスよく発展させる必要が有る。そのためには、要素技術の積み上げから総合へ、そして医療・健康への具体的応用を目指して一貫した研究方策が不可欠である。今回の公開講座「生体のナノフィールド動態観察」がバイオイメージングとナノテクノロジーを結ぶ計測技術プラットフォームの体系的確立を進める原動力となれば幸いである。



### 3-1 SQUIDを用いた磁気的バイオ計測

円福敬二  
九州大学・大学院システム情報科学研究院

#### 1. 磁気的バイオ計測法

抗原—抗体結合反応を磁気ナノマーカと SQUID 磁気センサを用いて磁気的に検出するシステムを開発している。磁気的に標識された抗体（磁気マーカ）を抗原に結合させ、磁気マーカからの磁気信号を測定することにより反応検出を行う方法である。従来の光学的方法に比べて次のような利点が期待されている。（1）磁気的方法では、いわゆる“洗いの工程”を省略することが出来る。（2）超高感度磁気センサを用いることにより、検出感度を大幅に改善できる。（3）光信号と異なり磁気信号には信号に対する障害物がない。

#### 2. SQUID 磁気顕微鏡

微量な抗原—抗体結合反応を検出するためには、磁気マーカからの微弱な信号磁界を高感度に測定する必要がある。SQUID センサは超高感度の磁気センサとして知られており、本目的には最適なものである。しかしながら、SQUID センサは液体窒素温度( $T=77\text{ K}$ )で動作するため、冷却されたセンサと室温( $T=300\text{ K}$ )の試料との距離を  $1\text{ mm}$  程度に近接する必要がある。この条件を満足するための、いわゆる SQUID 磁気顕微鏡を開発している。

#### 3. 免疫診断用磁気マーカ

市販されている磁気マーカは抗原の分離・精製のために開発されたものであり、その特性は免疫検出用には不十分である。このため、免疫検出に適した磁気ナノマーカを開発している。すなわち、磁気ナノ粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )の直径を通常の  $10\text{ nm}$  から  $25\text{ nm}$  と大きくし、これを直径が  $80\text{ nm}$  の高分子で包み、その表面に抗体を結合した磁気マーカを開発している。この磁気マーカは市販のものに比べて 5 倍以上の磁気信号を発生するとともに、大きな磁界で磁化した後には残留磁気を保持することが出来る。

#### 4. 抗原—抗体結合反応の測定

SQUID 磁気顕微鏡と免疫診断用磁気マーカを用いて、磁気的な抗原—抗体結合反応の検出を行った。抗原としては IL8 を使い、IL8 の量を変化させたときの磁気マーカからの磁気信号を測定した。両者の間にはほぼ比例関係が得られ、現状では  $5\text{ pg}$  までの IL8 の検出に成功している。ただし、現状では基板に含まれる磁気不純物により検出限界が制限されているため、基板の高純度化により検出限界を改善できる。なお、SQUID システムの感度からは  $0.1\text{ pg}$  までの IL8 の検出が期待できるため、従来に比べて 100 倍高感度なシステムの実現が期待できる。