

200400204A

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

# 半導体などナノ粒子による DDS

(H14-ナノ-004)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 本 健 二

平成17（2005）年3月

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

# 半導体などナノ粒子による DDS

(H14-ナノ-004)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 本 健 二

平成17（2005）年3月

# 目次

## I. 総括報告

半導体などナノ粒子による DDS

主任研究者

山本 健二 (国立国際医療センター研究所・副所長) . . . . . 3

## II. 分担研究者報告

### 1. 半導体などナノ粒子による DDS 研究班

#### 1) 量子ドットの多臓器不全診断治療への応用

山本 健二(国立国際医療センター研究所・副所長) . . . . . 13

#### 2) ヒト血液細胞などに対する遺伝子導入効率改善による効果的 DDS 技術開発

湯尾 明(国立国際医療センター・血液疾患研究部・部長) . . . . . 19

#### 3) ナノ粒子の感染症研究への応用について

切替 照雄(国立国際医療センター研究所・感染症制御研究部・部長) . 21

#### 4) 生物・医療応用 QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析

土肥 多恵子(国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部・部長) 27

#### 5) 腎疾患治療に向けた DDS

名取 泰博(国立国際医療センター研究所・臨床薬理研究部・部長) . . 31

#### 6) 半導体などナノ粒子による DDS

加藤 規弘(国立国際医療センター研究所・臨床薬理研究部・部長) . . 33

#### 7) 血管炎の治療と解析を目的とした DDS 用 Qdot 標識抗 MPO 抗体の開発

鈴木 和男(国立感染症研究所・生物活性物質部・室長) . . . . . 35

#### 8) CdSe/ZnS コアシェル型の半導体ナノ粒子の DNA 損傷性の検討

太田 敏博(東京薬科大学・生命科学部・助教授) . . . . . 43

### 2. アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 研究班

#### 1) アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS

落谷 孝広(国立がんセンター研究所・室長) . . . . . 47

### 3. ナノミセルによる DDS

#### 1) 生物・医療応用 遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルの評価

斯波 真理子(国立循環器病センター研究所・室長) . . . . . 51

#### 2) 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・材料学・教授) . . . . . 57

4. 研究協力者  
佐々木 有(国立八戸高等専門学校・教諭)

Ⅲ.	研究班会議	67
Ⅳ.	研究成果の刊行に関する業績一覧	79
Ⅴ.	研究成果の刊行物・別刷	107

## 半導体などナノ粒子による DDS

### 主任研究者

山本健二 国立国際医療センター研究所・副所長

### 分担研究者

#### 1. 半導体ナノ粒子による DDS 研究班

湯尾明（国立国際医療センター研究所・血液疾患研究部・部長）

切替照雄（医療センター研究所・感染症制御研究部・部長）

土肥多恵子（医療センター研究所・消化器疾患研究部・部長）

名取泰博（国立国際医療センター研究所・臨床薬理研究部・部長）

加藤規弘（国立国際医療センター研究所・遺伝子診断研究部・部長）

近藤昭彦（神戸大学工学部科化学工学科・教授）

鈴木和男（国立感染症研究所・生体防御研究室・室長）

太田敏夫（東京薬科大学・環境生物学部・助教授）

#### 2. アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 研究班

落谷孝広（国立がんセンター研究所・腫瘍転移・室長）

#### 3. ナノミセルによる DDS 研究班

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・室長）

片岡一則（東京大学大学院工学系研究科・材料学・教授）

#### 4. 研究協力者

佐々木有（国立八戸高等専門学校・教諭）

### 研究概要

現在様々な薬物が開発されている。本来想定していた作用とは、異なる作用を有するものもある。その予期しなかった作用は、人体に危害を加える場合も多々有る。また、薬物の性状を変えるために添加剤を用いることがある。その両者が、特に大きな危害を持たなくても複合すると、大きな副作用があるものも出ている。このような予期せぬ副作用が、人体のどこで起こっているものなのかという問いに答えるだけの評価技術、計測技術は、未だ十分開発されていない。

一方近年様々な新規機能材料が開発され、産業に利用されようとしている。これらの新規材料は、エネルギー、IT、生物・医療等様々な分野で従来の効率を遥かに上回る可能性のあるものばかりである。その新規機能材料の一つに量子ドットがある。本研究は、この量

量子ドットを用いてタグ付き薬物による治療システムを開発した。これにより、人体の臓器局在性、細胞内局在性も解析することが可能と成る。

この半導体ナノ粒子をはじめ、下記に示しているように本研究では、アテロコラーゲンナノ粒子、ブロック共重合体を用いた薬剤伝達システムの開発を行っている。

#### 1) 半導体ナノ粒子を用いた薬剤伝達システムの開発

一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾し、薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的にしている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果などによる、蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することを目的としている。薬剤伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたってQOLの向上を目指す

#### 2) アテロコラーゲンナノ粒子を用いた薬剤伝達システムの開発

バイオマテリアルの一種であるアテロコラーゲンがDNAや核酸医薬と静電的な相互作用して複合体を形成し、効率よく細胞に取り込まれた後、遺伝子の発現や制御に有効であることを明らかにしてきた。このアテロコラーゲンと小さな二重鎖RNA(siRNA)との複合体はナノサイズの粒子を形成することが明らかとなり、疾患部位に応じた様々なデリバリーシステムの構築が可能であった。本年度は、この複合体の遺伝子医薬としての有効性を動物モデルで詳細に検証した。

#### 3) ブロック共重合体を用いた遺伝子伝達システムの研究開発

本研究の目的は、合成高分子であるブロック共重合体の分子設計を通して、効率的な遺伝子導入、高い生体適合性およびベクター自体の低毒性化を実現する新しい遺伝子ベクターシステムを構築し、その遺伝子治療における有用性を明らかにすることにある。本年度は、前年度において確立したアミノリンス法を利用することにより、siRNA およびプラスミドDNAを効率的に細胞内に導入できる高分子ミセル型ベクターを開発した。さらに、全身投与による標的選択的遺伝子デリバリーを視野に入れ、遊離ポリカチオンが存在しない条件で効率的な遺伝子を実現する新規3層高分子ミセル型ベクターを設計し、その有用性を確認した

### A. 研究目的

#### 1) 研究の背景

一昨年度より我々は、現在飛躍的な進歩を遂げているナノテクノロジーを利用し、薬剤を効率良く患部に運び、極少量の薬物量でも局所的に高濃度となり、ターゲットに対して有効性を示す薬剤伝達システムの開発を行っている。副作用を軽減し、安全で効率の良い治療が可能となるよう、研究開発を続けている。

またこれまで摂取した薬剤が必要な部位以外にの臓器にも到達しそこで副作用の引き金となる反応が起こるため、安全な薬剤として利用する事が不可能であったものも、薬剤として利用可能となるよう、特定部位には、薬剤伝達しないアンチドラッグデリバリーシステムを提唱し考えている。このため安全で有効なドラッグデリバリーシステムの開発を目指すナノ粒子の研究開発が必要と

なり、それを行ない、またこのシステムを動物にて評価を初めている。

## 2) 目的

ナノ粒子の利用法について近年様々な展開が見られる。例えば量子ドットについて考えてみた場合、量子メモリー、RGBの量子ドットを用いたディスプレイ等の工業的利用、プローブとしてのイメージング技術への応用やドラッグデリバリーシステムのキャリアーとして等の生物・医療応用など幅広い分野に渡っている。

特徴のある新規材料を利用するにあたって、現在知られていない様々な性質が存在すると考える。今後これら新規材料の製造過程、利用方法、廃棄に於ける安全性の検討が必要となってくるだろう。またこのような新規材料を再利用するなどリサイクルについての技術開発も必要である。本研究において、量子ドットの安全性は、その表面加工をよび製造プロセスによる残留物の除去によって著しく改善されることを示した。また現在シリコンをコアとするナノ粒子の製造に着手している。

半導体 QD (半導体ナノ粒子) は、蛍光性を持ち、蛍光持久時間が長く、サイズにより異なる蛍光色を発する性質を持つが親水性に乏しく、また塩濃度、Ph などにより、細胞培養条件では凝集し易く医薬生物学への応用が困難であった。昨年我々は、この半導体ナノ粒子を表面加工し医療への応用が十分可能であるようにした。そのような観点に立ち立生物材料などを通じた、バイオナノ工学的に自己組織化法による蛍光ナノ粒子の合成を行ない、超極限分子プローブとして副作用の軽減を行うことが可能な薬物設計を行うシステムを開発している。

本研究のもう一つのアプローチとしてアテロコラーゲンを用いて遺伝子との複合体は条件によってはナノサイズの粒子を形成する。このナノサイズ複合体の安定な供給をはかるとともに、そこにさま

ざま成分を共存させることによって、治療用外来遺伝子を体全体あるいは特定の作用部位へとデリバリー可能な画期的な技術を提供することがアテロコラーゲンナノ粒子による DDS 開発研究班の研究目的である。

また高分子ナノミセルについては、分担研究者の片岡が世界に先駆けて高分子のナノ集積手法に基づいて創製した高分子ナノミセルであり、は、ウサイズがウイルス (~50 ナノメートル) と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。本研究においては図に示すように、遺伝子等を内核に搭載した超機能化高分子ミセルの開発を行い、「必要な時 (timing) に、必要な部位 (location) で、必要な診断や治療 (action)」を最小限の副作用で達成する「ナノ遺伝子治療」を創出する。

## 3) ゴール

半導体ナノ粒子開発においては、米国におけるナノテクノロジー研究の最重点課題の一つとされている量子サイズ効果 (Quantum Dots) 理論に基づき、半導体が長時間蛍光を保持し、サイズにより蛍光色が異なるという極めて特異的な性質を利用して、生体に安全でかつ様々な機能を果たす半導体ナノ粒子の開発を行なう。また、開発したナノ粒子に薬物を結合させた (Tagging) 物質の細胞 (血球細胞、血管内皮細胞等)、組織、生体における薬物動態を解析することにより、そのメカニズムを解明し、有効な薬物伝達システム (DDS) の開発を目指している。

またアテロコラーゲンナノ粒子による遺伝子ベクター研究開発では、アテロコラーゲンと遺伝子のナノサイズの複合体の安定な供給をはかるとともに、そこにさまざまな成分を共存させることによって、治療用外来遺伝子を体全体あるいは特定の

作用部位へとデリバリー可能な画期的な技術を提供することが研究目的である。

さらに超機能高分子ミセルは、ウイルスと同等という微小なサイズでありながら、分子認識能や環境応答などのマルチ機能搭載可能な超機能高分子ミセルであり、表面を生体適合化することも可能であるため、遺伝子等を内核に搭載した超機能分子ミセルを用い、肺高血圧症、高脂血症、虚血性冠動脈疾患の再狭窄予防などを視野にいれ、臨床応用可能な治療システムの開発を目指す。

#### 4) 研究の発展

界面活性剤などを利用して一桁ナノ空間を作成しその空間の中に半導体を自己組織させるものである。遷移金属やシリコンによる半導体は、一桁ナノメートルの小さな粒子（クラスター）にまでなると量子サイズ効果により様々な特異的性質を持つようになる。金属クラスターは、蛍光を発することができ、その蛍光色は粒子の径が小さいほど小さな波長の蛍光色と成る。其の蛍光を得るための励起光は、蛍光波長より短い波長ならばよい。またこのナノ粒子は、一度励起された後、さらにもう一度励起すると光量が増すと言う量子メモリー効果を持っている。Cd/Se からなる半導体は、さらに安定化するために ZnS の外殻を持って安定化させ全体で 4 nm 程のナノ粒子を得ることができる。このナノ粒子はトルエンなどの有機溶媒には可溶であるが、水溶液にはほとんど解けないため生物・医療応用するためには水溶性表面加工を行って水溶液中でも溶解させることができる。表面加工としては、有機酸、アクリル酸、シロキ酸、アミンなどである。これら表面加工を行い、表面加工を行った官能基を用いて生体分子、例えば蛋白、オリゴペプチド、核酸などに結合（Tagging）させることが可能である。

このナノ粒子を親水加工し、同時に薬物を結合させ、薬剤の生体内動態観察可能な

量子ドットタグ付き薬物を製造することに成功した。これに関わる動物実験を行い薬物の効果を保ちながら各臓器における局所濃度の計測に極めて有効であることが判明した。安全で安心な薬物であることが生体内動態観測で評価できるシステムを創出することを目的としている。

#### 5) 具体的な目標

半導体ナノ粒子、アテロコラーゲンナノ粒子、ブロックポリマーの 3 つに分けてその各々の目的を以下に記述する。

##### (a) 半導体ナノ粒子

本研究は、半導体などナノ粒子を用いて薬剤伝達システムを開発することを目的としている。薬剤伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたって QOL の向上を目指す。しかしながら、ガン治療に於ける薬剤伝達システムは、現在 EPR 効果によるところが大きい。これは、ガン組織がある程度以上大きく成り、血管新生が起こった時にその新生血管の疎な間隙を通過することを期待して効果を出すシステムである。しかしながら、よく用いられているミセル型のキャリアーは、10 nm 以下することが、現在不可能であるため実際様々な制限が有る。そこで、従来の不都合な点を、解決するには更に小さなキャリアーを使用する必要性があり、現在我々は、1~8 nm の半導体を薬剤キャリアーとして用いるシステムを開発している。通常このサイズのことをナノ粒子と呼んでいる。このサイズならば、薬物を結合させても 10 nm 以下となり生体のほとんどの場所に伝達できる可能性があり、また排出も透過型電子顕微鏡を使って尿から行われることが確認されている。そのため安全性についても期待することができる。

また半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが可能であるため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。そのため、薬物に結合された量子ドットを体外から追跡することも可能であり、副作用や安全性について詳しく検討することが可能である。特に血中濃度や、臓器分布



などが、放射性同位元素を用いないで単に蛍光を測定すれば知ることができるという利点がある。個人による、濃度分布の違いなど検便に行うことが可能であるため、特に個人個人特異的な副作用についてモニターすることができるようになる。

薬物についての個人の差により、副作用が出、また健康を極めて害する場合も起きている。本研究では、疾患臓器に特異的に局在できるような表面加工を行う方法を既に、(肺特異的、肝臓特異的の表面加工法)を開発している。一方、細胞レベルではライソゾーム、核、ミトコンドリアなど細胞小器官に伝達することを実現している。これらを統合することにより生体において、臓器特異的、細胞内小器官特異的に薬剤を効率良く伝達できるシステムを構築することが可能である。その応用例として遺伝子治療のベクターとしても期待することが可能であり、動態追跡とあわせて安全で安心な遺伝子伝達システムとしても期待される。

#### (b)アテロコラーゲンナノ粒子

我が国の死因の第一位の座を占める疾病は21世紀に入っても「がん」である。がんは働き盛りの青壮年の最大の死因でもあり、保健医療上の対策の重要性は極めて高い。がんの本態はゲノムの不安定性そのものであり、多段階発がん過程によって複数の遺伝子構造・発現異常が集積することにある。このような研究を背景に、がんの大規模なゲノム解析が、診断・治療の創薬標的を同定し、個別化された予知医療を確立するために行われてきた。その成果が新たながん関連遺伝子・治療応答性関連遺伝子やその候補領域を多数同定することにつながっている。これからの研究の焦点は、従来の研究から多数同定されつつある創薬標的候補遺伝子の絞り込みをいかに効率的に実施し、魅力的な創薬標的をひとつでも多く同定することである。ついで求められるのは、それらの候補を医薬品開発のスキームにうまくのせて、産官連携による新薬開発と臨床試験の推進である。この一連の過程でいくつかのテクノロジーが急発展をみせている。そのひとつが遺伝子

の機能を制御することのできるRNAiテクノロジーである。その本体であるsiRNAの核酸医薬品としての期待は大きく、がんを含めた多くの疾患や感染症に対する新規の治療法として注目されている。本研究ではそのsiRNAのデリバリー方法として注目されるアテロコラーゲンDDSによるナノ粒子のデリバリー・テクノロジーを中心に、マウスを用いたヒト精巣腫瘍モデルやヒト前立腺がん骨転移モデルにおけるsiRNAの核酸医薬品としての能力を検討する。

#### (c) ブロック共重合体

近年、ナノテクノロジーを基盤とした診断・治療システムに対する期待が高まっている。本研究分担者である片岡が世界に先駆けてコンセプトを打ち立てた高分子ナノミセルは、ウイルス(〜50ナノメートル)と同等という微小サイズでありながら、分子認識機能や環境応答能などマルチ機能を搭載可能な超分子システムであり、薬物や遺伝子の実用的なキャリアシステムとして期待される。本研究においては図1に示すように、薬剤および遺伝子(プラスミドDNA:pDNA)やsiRNAなどの核酸医薬品を標的細胞に導入し、効率的に機能発現させる超機能化高分子ミセルを創出する。高分子ミセルの設計においては、担持する薬物分子の特性に応じて内核を構成する高分子鎖の化学構造を最適化する(第1世代)。更に、外殻への効率的な標的指向性分子の導入法を確立し、細胞選択的なターゲティングを可能とする(第2世代)。第3世代の高分子ミセルにおいては、局所温度変化等の環境変化に鋭敏に応答するように内核・外殻の構造制御を行う。

## B. 研究結果

本年度は以下の成果が得られた

### 1) 半導体ナノ粒子による DDS

(1) 半導体ナノ粒子による DDS

(2) ヒト血液細胞などに対する遺伝子導入効率改善による効果的 DDS 技術開発

- (3) QD を用いた in vivo 細胞トラフィックの解析
- (4) 腎疾患治療に向けた DDS
- (5) 半導体などナノ粒子による降圧剤 DDS
- (6) 血管炎の治療と解析を目的とした DDS 用 Qdot 標識抗 MPO 抗体の開発
- (7) 半導体などナノ粒子による DDS ピンポイント DDS
- (8) CdSe/ZnS コアシェル型の半導体ナノ粒子の DNA 損傷性の検討
- 2)アテロコラーゲンナノ粒子による DDS
- 3)機能高分子ミセルによる遺伝子導入システム
- (1) 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
- (2) 子導入ベクターとしての架橋ミセルの評価

以下に主任研究者および分担研究者の研究概要を記載する。詳細は、各分担の項参照。

(1) 半導体ナノ粒子の生物・医療応用班当初の研究計画は、半導体などのナノ粒子を用いて薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的にしている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果などによる、蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することを目的としている。

安全性についての検討は、本年度 MTT アッセイ法を用いてミトコンドリアの呼吸能力を計測することにより行った(A. Shiobara et al., Microbiol. Immunol 2004)。この研究により、細胞毒性については、閾値が存在することを明らかにした。これにより安全基準を設定することが可能となり、医療応用および産業化において重要な一歩をクリアしたことになった。また本年度さらにこの細胞毒性は、ナノ粒子の表面加工に深く依存し様々な表面加工により生物・医療応用に最適な表面加工およびその

製造過程を明らかにした(A. Hoshino et al., Nano Letters (2004))。

さらに本年度、降圧剤に結合することに成功し、量子ドットのマーカーをつけた薬物の作成に成功した。さらにこのマーカー付き薬物(ACE 阻害薬)を、in vitro で薬物活性が存在することを明らかにした。更にこのマーカー付き薬物を、家族性高血圧ラットに投与したところ最高血圧が 50 mmHg 優位に低下した。このことにより、in vivo においても薬物活性を示し、また同量の同じ薬物を投与するより更に長時間の薬物効果を得た。またこの成果は、量子ドット国際シンポジウム St. Jose CA, USA 2005 に発表し大きな成果を得た。現在論文等稿準備を行っている。

(2) 細胞は主にヒト白血病細胞株 (U937, HL-60) とマウス血液細胞株 (P388D1, J774.1) を検討対象とした。

プラスミドの導入効率を検討するために、GFP 蛋白をコードする発現プラスミドを用いた。FITC 以外の蛍光マーカーとして、量子ドットを用いた。

今年度において試みた遺伝子導入促進法は、HVJ エンベロープベクターであった。

カニクイザル ES 細胞の分化培養系を試行錯誤した。

HVJ エンベロープベクターは、遺伝子の導入のみならず蛋白の導入にも応用できることが確認された。

マウス血液細胞株を用いた検討においては、HVJ エンベロープベクターは量子ドットの導入効率を著明に改善し、細胞質に直接導入されていると考えられた。

サル ES 細胞を用いた分化培養系においては、培養皿底面に基質蛋白を表面塗布して、無フィーダー培養系を確立し、血液細胞、血管内皮細胞などを高い純度で分化誘導することに成功した。

(3) 本研究では消化管に存在する免疫担当細胞がどの様にその特徴的な機能を獲得していくかを明らかにすることを最終目的として、蛍光を発するナノ粒子 QD の特質を利用して細胞をラベルし、消化管と他の臓器との細胞交通を解析することを目指した。マウス腹腔内マクロファージまたは骨髄由来マクロファージを調整し、

QD655 によるラベルの後、マウス腹腔内または末梢血中にもどし、同時にトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)の注腸によって急性腸炎を誘導した。24 時間後、ラベルした細胞の分布を解析したところ、骨髄由来マクロファージは投与ルートに関わらず大腸粘膜固有層に達していたのに対して、腹腔内マクロファージは炎症部漿膜と穿孔部に集積し、壁内への浸潤はみられなかった。腹腔マクロファージ集積のメカニズムとして、炎症刺激による腹腔マクロファージ由来ケモカイン CCL1 の分泌とその受容体 CCR8 の特異的な上昇が明らかになった。

(4) 我々はこれまで、ステロイド剤を内封した塩基性脂質添加ポリエチレングリコール修飾リポソームが半月体性糸球体腎炎の動物モデルにおいて糸球体に集積し、フリーのステロイド剤よりはるかに少量で治療効果を示し、腎炎治療に有効な DDS となり得ることを報告した。今年度は、このステロイド剤内封リポソーム製剤が示す治療効果のメカニズムについて調べた。その結果、フリーのステロイド剤は糸球体内への白血球浸潤や炎症性メディエーターの産生を抑制して治療効果を示すのに対し、リポソーム製剤の場合には浸潤白血球数や炎症性メディエーターの mRNA のレベルは未治療群と差がなく、ポーマン囊上皮細胞の増殖や線維化(細胞外マトリックス産生)に違いがあることがわかった。ステロイド剤内封リポソーム製剤はフリーのステロイド剤とは異なる機序で治療効果を示すことが示唆された。

(5) 本研究の目的は、低侵襲な方法(注射等)により生体内で標的部位へピンポイントに薬剤、遺伝子、タンパク質等を輸送して効率よく導入する方法を開発することである。本年度は、血圧降下薬の一つカプトプリルに量子サイズドット(Quantum Dot: QD)をラベルしてラットに経静脈投与した際、未ラベルのものと同程度に、血圧降下作用があること、また QD の発する

蛍光をもとに臓器および細胞内局在を検証できることを確認した。

(6) 血管炎の発症要因の解析と治療法開発を目的とし、DDS 用 Qdot 標識抗 MPO 抗体を開発している。本年度、ナノイメージングによる血管炎発症機序用プローブを開発し、DDS および解析への応用を検討した。血管炎の発症にかかわる活性化好中球の表面には、MPO-ANCA(好中球自己抗体 -myeloperoxidase-anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody)の抗原 MPO が表出する。病因・病態の解明には、MPO 抗原の表出の定量が不可欠であったが、これまでの蛍光標識物質では、ほとんど定量できなかつた。そこで、Qdot で標識し、mouse MPO に対する rabbit 抗体を使用することにより定量性を確保できた。本結果より、組織に侵入した活性化好中球を標的とする DDS 法の開発が可能となった。

(7) 本研究の目的は、低侵襲な方法(注射等)により生体内で標的部位へピンポイントに薬剤、遺伝子、タンパク質等を輸送して効率よく導入することで、副作用を軽減することができるキャリアー(運搬体)を開発することである。本研究では B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)粒子をキャリアーとして用いることを試みた。この粒子は、ウイルスゲノムを除去したタンパク質中空ナノ粒子であるため、内部に薬剤等を封入することで、ヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入することができる。本年度は、このタンパク質中空ナノ粒子に外来タンパク質を封入し、ヒト肝臓に特異的に導入することを試みた。モデルタンパク質としてオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質(GFP)を用い、HBsAg タンパク質の C 末端側に融合させて形成した粒子が、ヒト肝臓に効率よく量子ドットを導入する予定である。

(8) 種々の親水性有機化合物で表面被覆した CdSe/ZnS コアシェル型ナノ粒子(QD)の DNA 損傷性の有無について、ヒトのリンパ腫由来の WTK1 細胞を用いたコメットアッセイで調べた。親水加工材料として 11-mercaptoundecanoic acid (MUA)、Cysteamine、および Thioglycerol を用いた。WTK1 細胞を限外濾過精製 QD で 2 時間処

理した後、常法にしたがってアガロースゲルに包埋したスライド標本を作成し、細胞を低温でアルカリ溶解後、アルカリ条件下 (pH13, 0°C) で DNA unwinding と電気泳動を行った。1 本鎖 DNA 切断によって核から流れ出す DNA 断片を、エチジウムブロマイドで染色して DNA 移動距離 (tail length) を 50 個の核について測定した。MUA で表面加工した QD-COOH は 200  $\mu$ g/ml の用量で WTK1 細胞に DNA 損傷を弱く誘発したが、Cysteamine で表面加工した QD-NH<sub>2</sub>、Thioglycerol で表面加工した QD-OH には DNA 損傷性は認められなかった。以上の結果から、QD の DNA 損傷性は親水性加工に用いた化合物の性質に依存していることが示唆された。

## 2) アテロコラーゲンによる DDS

### (1) ヒト精巣腫瘍モデルへの局所投与

すでに前年度の研究で明らかになった、アテロコラーゲンと siRNA を最適な濃度比率によって混合し、200 ナノメートル以下のナノ粒子を形成させた。これを、ヌードマウスの精巣にヒト精巣腫瘍細胞を投与して得られた精巣腫瘍モデルの腫瘍部に局所投与した。用いた siRNA は精巣腫瘍細胞過剰発現しているヒト FGF-4 遺伝子の発現を 90% 抑制することが確かめられている配列である。その結果、投与された siRNA とアテロコラーゲンのナノ粒子は腫瘍内に数日間とどまり、腫瘍の FGF-4 遺伝子の発現をタンパク質レベルでも抑制した。さらに、バイオイメージング法によって腫瘍の経時的観察を行ったところ、腫瘍の増殖が顕著に抑制された。

(2) 膚炎モデルマウスへの全身性投与  
アテロコラーゲンと核酸との複合体であるナノ粒子の静脈内投与による全身性デリバリーが可能であるかどうかを検討するために、まずアンチセンスオリゴヌクレオチドとのナノ粒子を、接触性皮膚炎を耳に惹起させたマウスの尾静脈から投与した。アンチセンスは、ICM-I に対する合成オリゴヌクレオチドで、すでにこのアンチセンスが炎症を抑制するように働くことは確認されている。その結果、マウスの耳の部位での炎症は顕著に抑制され、目立った毒性も認められなかった。

### (3) 骨転移モデルマウスへの投与

ヒト前立腺がん細胞を免疫不全マウスの左心室から投与すると、20 日前後で、全身の骨に転移したマウスモデルを造ることができる。まず骨転移巣への siRNA のデリバリーを検討するために、ヒト前立腺がん細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼを安定に発現する細胞株を取得した。この細胞の増殖は、そのルシフェラーゼをイメージングすることで、生きたマウスでの腫瘍の増殖をリアルタイムに解析することができる。このマウスに対して、ルシフェラーゼを抑制する GL3siRNA をアテロコラーゲンとのナノ粒子として投与し、バイオイメージング解析を行った結果、顎や大腿骨といった骨点移送の隅々まで siRNA がデリバリーされ、そのルシフェラーゼの発現を 90% も抑制することが判明した。

## 3) 超機能高分子ミセルによる遺伝子導入システム開発班

### (1) 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

#### 1) PEG-DPT による siRNA 内包ミセルの調製と siRNA 活性の評価

N/P 比を変化させて PEG-DPT と siRNA を混合したところ、N/P=2 以上の条件において siRNA が完全にコンプレックス化されることが確認された。siRNA 内包ミセルによるルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制活性を評価したところ、N/P 比依存的に遺伝子発現抑制活性が上昇し、N/P=10 以上において 80% 以上の発現抑制活性が確認された (図 4)。市販の siRNA 導入試薬 (RNAiFect) は、50% 血清中で 30 分前培養することにより遺伝子発現抑制活性は大幅に減少したが、siRNA 内包ミセルは血清中における前培養後においても高い siRNA 活性を維持できることが確認された。また、内在性遺伝子 (Lamin A/C) の siRNA による遺伝子ノックダウンにおいても、高分子ミセルは RNAiFect と比較して著しく高い効果を示すことが明らかになった。

#### 2) 遺伝子デリバリーのための 3 層高分子ミセルの調製と機能評価

余剰のフリーポリマーが存在しない条件において、高い遺伝子発現活性を実現するために、3 つの異なる機能性セグメントを

連結したトリブロック共重合体(PEG-PMPA-PLL)を合成し、pDNA との混合により高分子ミセルを調製した。その結果、N/P=3.4(Lys/nucleotide ratio=2.0)において、表面電位がほぼ中性(+7.3mV)で粒径88nm の会合体が形成されることが確認された。重要なことに、この条件においては、余剰のフリーポリマーは系中に存在せず、PLL 鎖が選択的に pDNA を凝縮し、PMPA 鎖はフリーで存在することが高分子ミセルの <sup>1</sup>H-NMR 測定により確認された。この結果より、トリブロック共重合体より形成された高分子ミセルは、pDNA を凝縮した内核、バッファー能を有する PMPA 鎖からなる中間層、生体適合性外殻の3層構造を有することが示唆された(図3)。これは、イオンコンプレックス形成による pDNA の安定化と細胞質内輸送の促進のためのポリカチオンのバッファー能の維持という合成ベクターに要求される二律背反的な特性を同時に満たす新しい設計であると考えられる。実際に、培養細胞に対するレポーター遺伝子の導入実験において、3層高分子ミセルは、従来の PEG-PLL からなる pDNA 内包ミセルと比較して1桁以上高い遺伝子発現活性を示し、PMPA 鎖のバッファー能に基づき効率的な遺伝子発現が達成されていることが Chloroquine や Nigericin などの薬剤を用いた遺伝子導入実験により確認された。

### 3) 表層に環状 RGD リガンドを導入した高分子ミセルの調製と機能評価

標的選択的遺伝子デリバリーを実現するために表層の PEG 末端に環状 RGD ペプチド表層に環状 RGD リガンドを導入した高分子ミセルの調製と機能評価

標的選択的遺伝子デリバリーを実現するために表層の PEG 末端に環状 RGD ペプチド(c(RGDfK))を導入した pDNA 内包高分子ミセルを調製した。環状 RGD ペプチドは、ガン細胞や血管新生部位などに特異的に発現する  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンに選択的に結合し、鎖状 RGDS と比較してインテグリンに対し非常に高い結合定数を有することが知られている。環状 RGD ペプチド(RGDS)導入高分子ミセル型遺伝子ベクターの性能を、HeLa 細胞に対するルシフェラーゼ遺伝子の導入効率により評価した結果を図5に示す。その結果、接触時間に拘らず、環状 RGD ペプチド導入ミセル

は、リガンドなしミセルおよび鎖状 RGDS 導入ミセルと比較して約5倍の遺伝子発現効率を示した。HeLa 細胞には  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンが発現していることが知られていることから、環状 RGD ペプチド導入ミセルは  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンとの相互作用を介して効率的に細胞内に取り込まれ、高い遺伝子発現活性を示しているものと考えられる。このように環状 RGD ペプチド導入ミセルは全身投与においてガンや動脈硬化部位を標的化できる遺伝子デリバリーシステムとして期待される。

### 3) 架橋ミセルの in vitro 遺伝子導入

遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルを評価するため、種々の細胞および細胞株を用いて、in vitro 遺伝子導入実験を行った。Cos-1 細胞への遺伝子導入は、SS 結合が13%のもので最大であった。

一方、HepG2 細胞、血管内皮細胞、ヒト単球由来白血病細胞株 THP-1 では、28%のSS 結合導入により、遺伝子発現が最大となった。また、いずれも37%の架橋導入により、遺伝子発現は低下していた。以上より、SS 結合を内核に導入することにより、in vitro での遺伝子発現を増加させることが可能であった。細胞それぞれに、最大の遺伝子発現をみとめる至適の架橋導入%が存在していた。

### (2) 子導入ベクターとしての架橋ミセルの評価

#### 1) 架橋ミセルによる in vivo 遺伝子導入

それぞれの%の架橋を導入した架橋ミセルを用いて、マウスの気管内投与を行い、1日後に肺での遺伝子発現を測定したところ、13%および28%の架橋導入により、有為な遺伝子発現を認めた。5%、37%の架橋導入、および架橋のないものでは、ほとんど遺伝子の発現を認めなかった。

#### (6) PEG-DET による in vivo 遺伝子導入実験

PEG-DET を用いてマウス気管内投与による in vivo 遺伝子導入実験を行い、Exgen (Linear PEI)および架橋ミセルによる遺伝子導入と比較した。PEG-DET を用いることにより、Exgen および架橋ミセルによる遺伝子導入に比し、約50倍の遺伝子発現を認めた。

### C.まとめ

本年度研究を通じて、半導体ナノ粒子の合成効率が、10倍以上に良く成った。そのため、今後様々な分野で使用されることが予想されるこの新規材料の安全性について今後十分検討していく必要性が出て来た。我々が合成している半導体ナノ粒子について、細胞毒性を調べて見たところ、いずれの直径のものでも 0.1mg 以下なら細胞毒性を示さずに使用可能であることが判明した。また更に近年多くの新規機能材料が設計・製造され使用され廃棄されている。また今後増々加速度的に新しい製造方法とともに世に出てくるだろうと考える。まず設計段階では、技術、ニーズなどのレベルでは異分野の交流が必要となる。また製造段階、使用段階、廃棄を通じて安全性について十分検討する必要がある。

昨年度我々は、タンパク質やその他の生体分子に結合させその細胞内動態を観察するのに十分な特性を有する事がしめせた。今年度我々は、細胞内動態解析のために必要な表面加工法を開発するとともに、実際開発された方法を利用して、細胞内分布や生体分布について、実際応用し今後新しいナノプローブの性能を評価した。すなわち半導体ナノ粒子を、リンパ球系株化細胞を用いそれを半導体ナノ粒子によって染色し、それをを用いてマウス生体に尾静脈より導入した。10日間の観測により、7日間は、血管内に導入された細胞のほとんどが存在したが、その後、肺、脾臓に集積することが確認できた。本年度、降圧剤に結合することに成功し、量子ドットのマーカーをつけた薬物の作成に成功した。さらにこのマーカー付き薬物(ACE 阻害薬)を、in vitro で薬物活性が存在することを明らかにした。更にこのマーカー付き薬物を、家族性高血圧ラットに投与したところ最高血圧が 50 mmHg 優位に低下した。このことにより、in vivo においても薬物活性を示し、また同量の同じ薬物を投与するより更に長時間の薬物効果を得た。またこの成果は、量子ドット国際シンポジウム St. Jose CA, USA 2005 に発表し大きな成果を得た。

また一方、細胞レベルではライソゾーム、核、ミトコンドリアなど細胞小器官に伝達することを実現している。これらを統合することにより生体において、臓器特異的、細胞内小器官特異的に薬剤を効率良く

伝達できるシステムを構築することが可能である。その応用例として遺伝子治療のベクターとしても期待することが可能であり、動態追跡とあわせて安全で安心な遺伝子伝達システムとしても期待される。

このことより、生物・医療における更に安全な展開に向けての素地が築かれたと言える。

D. 健康危険情報  
特になし。

E. 研究発表  
論文発表一覧および学会発表または、分担者の項参照。

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 量子ドットの多臓器不全診断治療への応用

分担研究者 山本 健二 国立国際医療センター 研究所・副所長  
協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員  
協力研究者 真鍋 義則 国立国際医療センター研究所・研究生  
協力研究者 藤岡 宏樹 国立国際医療センター研究所・研究生  
協力研究者 塩原あまね 国立国際医療センター研究所・研究生

### 研究要旨

本研究は、一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾し、薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的にしている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果などによる、蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することを目的としている。薬剤伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたって QOL の向上を目指す。

### A. 研究目的

本研究は、半導体などナノ粒子を用いて薬剤伝達システムを開発することを目的としている。薬剤伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたって QOL の向上を目指す。しかしながら、ガン治療に於ける薬剤伝達システムは、現在 EPR 効果によるところが大きい。これは、ガン組織がある程度以上大きく成り、血管新生が起こった時にその新生血管の疎な間隙を通過することを期待して効果を出すシステムである。しかしながら、よく用いられているミセル型のキャリアーは、10 nm 以下することが、現在不可能であるため実際様々な制限が有る。そこで、従来の不都合な点を、解決するには更に小さなキャリアーを使用する必要性があり、現在我々は、1~8 nm の半導体を薬剤キャリアーとして用いるシステムを開発している。通常このサイズのをナノ粒子と呼んでいる。このサイズならば、薬物を結合させても 10 nm 以下となり生体のほとんどの場所に伝達できる可能性があり、また排出も透過型電子顕微鏡を使って尿から行われることが

確認されている。そのため安全性についても期待することができる。

また半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが可能であるため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。そのため、薬物に結合された量子ドットを体外から追跡することも可能であり、副作用や安全性について詳しく検討することが可能である。特に血中濃度や、臓器分布などが、放射性同位元素を用いずに単に蛍光を測定すれば知ることができるという利点がある。個人による、濃度分布の違いなど検便に行うことが可能であるため、特に個人個人特異的な副作用についてモニターすることができるようになる。

薬物についての個人の差により、副作用が出、また健康を極めて害する場合も起きている。本研究では、疾患臓器に特異的に局在できるような表面加工を行う方法を既に、(肺特異的、肝臓特異的表面加工法)を開発している。一方、細胞レベルではライゾソーム、核、ミトコンドリアなど細胞小器官に伝達することを実現している。こ

れらを統合することにより生体において、臓器特異的、細胞内小器官特異的に薬剤を効率良く伝達できるシステムを構築することが可能である。その応用例として遺伝子治療のベクターとしても期待することが可能であり、動態追跡とあわせて安全で安心な遺伝子伝達システムとしても期待される。

## B. 研究方法

### 1. 量子ドットの合成と表面加工

研究に用いている半導体ナノ粒子はセレン化カドミウムを核、硫化亜鉛を殻とするコア・シェル型ナノ粒子である。この粒子は効果を持っているためこのように非常に均質な粒子直径を持つように製造される必要がある。

前述の記述のようにして合成された量子ドットは、疎水性化合物であるが、11-メルカプトウンデカン酸と硫化亜鉛とを結合させて粒子表面にカルボキシル基を出させることによって親水性粒子としている。更に現在ジペプチドなどで量子ドット表面を覆うことによって、水溶液中に分散できるように研究開発を行っている。

### 2. 薬物との結合

上記のようにして表面加工された量子ドットは、水によく分散する。そこで現在親水性薬物を用いて置換反応により、薬物を量子ドット表面に結合すると同時に水溶液中に分散させている。

### 3. 細胞内小器官への薬剤伝達

細胞内小器官への伝達については、本研究初年度アルブミンとの結合より、ライソゾームへの伝達に成功している。また2年度には、リポソームにより細胞質への伝達が可能と成った。本年度は、まず、上記のようにして得られた量子ドットに、アダプター分子を作成し、それを介してシグナルペプチドを結合させることを行っている。この方法により、安定に量子ドットとシグナルペプチドが結合され、また水溶液中にて分散可能となる。

### 4. 動物実験

上記のようにして作られた薬物量子ドット結合体を疾患モデル動物に投与する。薬物の効果、安全性、生体・組織局在性に

ついてデータを収集する。

## C. 研究結果

当初の研究計画は、半導体などのナノ粒子を用いて薬物の伝達システムの開発及び遺伝子伝達システムの開発を目的としている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ量子サイズ効果などによる、蛍光プローブとしての生物・医療応用を展開することを含めて検討することを目的としている。

安全性についての検討は、本年度 MTT アッセイ法を用いてミトコンドリアの呼吸能力を計測することにより行った(A. Shiobara et al., *Microbiol. Immunol.* 2004)。この研究により、細胞毒性については、閾値が存在することを明らかにした。これにより安全基準を設定することが可能となり、医療応用および産業化において重要な一歩をクリアしたことになった。また本年度さらにこの細胞毒性は、ナノ粒子の表面加工に深く依存し様々な表面加工により生物・医療応用に最適な表面加工およびその製造過程を明らかにした(A. Hoshino et al., *Nano Letters* (2004))。

さらに本年度、降圧剤に結合することに成功し、量子ドットのマーカーをつけた薬物の作成に成功した。さらにこのマーカー付き薬物(ACE阻害薬)を、*in vitro* で薬物活性が存在することを明らかにした。更にこのマーカー付き薬物を、家族性高血圧ラットに投与したところ最高血圧が50 mmHg 優位に低下した。このことにより、*in vivo* においても薬物活性を示し、また同量の同じ薬物を投与するより更に長時間の薬物効果を得た。またこの成果は、量子ドット国際シンポジウム St. Jose CA, USA 2005 に発表し大きな成果を得た。現在論文等稿準備を行っている。

## D. 考察

### 1. 達成度について

本研究は、今年度で3年目を終了する。量子ドットの製造法の改善により、当初の30倍を一度に生産可能と成り、製造・精製プロセスを改良した結果、安全性が飛躍的改善され、動物に使用可能と成った。また、細胞内小器官は、ライソゾーム、ミトコン



ドリア、核、サイトゾルなどピンポイントで伝達可能なキャリアーが開発できるまでに至った。実際動物実験を行う準備がすべて整い、プレリミナリーな実験が開始され、大きな成果を得ることができた。これにより当初の計画を十分に達成し、さらに、薬物動態解析、遺伝子治療についての技術開発も今後行える可能性が出て来た。

## 2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

、薬物動態を半導体ナノ粒子の可視光観察によって細胞・組織・臓器・生体レベルで解析する事は国際的に極めて重要である。また、この技術および成果を利用して薬物の動態を生きた動物で観測する事は、副作用のメカニズムを解析する上に於いても極めて重要である。さらに薬物をピンポイントに伝達する技術は、患者の負担を軽減し国民医療のみならず、社会的にも意義が大きいと考える。

### 3) 今後の展望について

次年度以降は、薬物にタギングした量子ドットをラットに投与し、もとの薬物活性を失わず有効に作用したという結果を、本年度得られたため、量子ドットを薬物キャリアーとして、ヒトへの応用をも視野に入れ本研究開発を行う。そのためには、(1)安全性を十分検討する、(2)結合可能な薬物について検討し、同時にまた対象と成る疾病を検討する、ことを行わなければならない。

前者については、本年度は、細胞レベルでのミトコンドリアの機能におよぼす影響およびアポトーシスについて詳しく検討した。次年度は、変異源性、腫瘍源性などについて細胞と動物両方をもちいて検討し、その結果によりヒトへの臨床応用に近づけることができる。

後者については、量子ドットと薬物との結合についての安定性、生体内に導入した時点の化学的修飾について質量分析および赤外分光試験による詳しく検討を行わなければならない。現在、赤外吸収スペクトルを用いて量子ドットさまざまな薬物や、ペプチドなど生体分子との結合状態の安定性について検討している。次年度には、結合した後の量子ドット付き薬物の性状を予想できるシステムを構築し、量子ドットの表面加

工について更に有効なものを選ぶことが、理論的に事前判るようにする計画である。また薬物を結合した量子ドットを回収し（例えば血液中に投与した薬物を結合した量子ドットは、蛍光があり、それを利用して、蛍光検出 HPLC により分離することが可能）質量分析を行い、その表面代謝について検討する。

またできうる限り多くの薬物についての効能を検討するため、疾病ごとの分担者が、実際これを行う予定である。

現在、量子ドットへの薬物タギングは、高血圧治療薬であるデアミノメチル・システニル・プロリン（商品名カプトリル）に対して行い家族性高血圧ラットを用いて動物実験を行っている。その結果同じ量の源末よりも持続時間が長いことが判明した。おそらく、数百のカプトリル分子が一つの量子ドット表面に結合しているために失活することが少なくなるためであると考えている。さらにメルカプトペンタスルホン酸（商品名メスナ）によるタギングに成功している。この薬物については、薬効を調べるのが困難であるが、量子ドットのスルホン酸加工に成功し、耐塩性 (NaCl 4N まで分散)、と耐酸性 (pH3.0 まで) に優れ新しい表面加工法として優れた性質を持つことが判明した。

次年度は、薬物内にカルボキシル基あるいは、アミノ基を有する

様々な薬物、例えば、抗ガン剤、抗生剤、糖尿病治療薬など幅広く薬物伝達システムの開発を行う計画である。

また、現在カプトリルについて検討中であるが、カプトリルタギングした量子ドットを家族性高血圧ラットの頸動脈から投与し、15分、1時間4時間24時間と経時的に採決し、その薬物有効性 (ACE 阻害活性) を測定し、またその蛍光強度との相関を解析する計画である。実際ラットの血液に in Vitro でカプトリルタギングした量子ドットを混入すると、その ACE 阻害活性と血液蛍光強度との間できれいな直線上にプロット可能であることから、未知サンプルの定量測定にも使える可能性があることを見いだした。この方法により、試験薬物を採血することにより、その血中濃度を推定することが可能であると考えられるので、in Vivo に於ける動物実験を行い確認する予定である。また、動物実験をさらに拡大し有効性

と安全性について検討する予定である。

またヒトへの臨床試験を目指すため、現在用いているカドミウム・セレンの半導体ナノ粒子に代わって現在、鉄ナノ粒子およびシリコンナノ粒子の開発を行っている。

さらに本年、我々は、核移行、或は、ミトコンドリア移行のシグナルペプチドを用いて量子ドットに結合させると、非常に高い効率で細胞内に侵入し、各々、ミトコンドリア、核に局所的に集積したことから、この量子ドットを用いて薬物を細胞内小器官特異的に伝達するシステムを開発する。特に核移行シグナルを用いて核特異的に薬物を伝達できるシステムについては、DNAを結合させることによってこのDNAを核まで伝達することができる可能性がある。核内に集積するDNA量を評価し高濃度ならば、遺伝子治療人工ベクターとしての役割を荷なうことができる可能性があり現在開発計画中である。

#### E. 結論

以上のように、本研究を通じて、半導体ナノ粒子によって薬物に結合させ安全に動物に投与することが可能と成った。また細胞レベルでは、ライソゾーム、サイトゾル、ミトコンドリア、核に伝達できる量子ドットドットキャリアーを開発した。

#### F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akiyoshi Hoshino, Kouki Fujioka, Taisuke Oku, Masakazu Suga, Yu F. Sasaki, Toshihiro Ohta, Masato Yasuhara, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification, Nano Letters 2004;4(10):2163-2169
- 2) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K. Quantum dots targeted to the assigned

organelle in living cells. *Microbiol Immunol.* 2004;48:985-994

- 3) Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; Application of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, Biochemical and Biophysical Research Communications 314 (2004) 46-53
- 4) Amane Shiohara, Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; On the Cyto-Toxicity Caused by Quantum Dots, *Microbiol. Immunol.*,48(9)(2004), 669-675
- 5) Kenji Yamamoto and Noriyoshi Manabe, Randomness and Organization of the Bio-Nano-Particles into the Functional Structure. Applied Mechanics, Science Council of Japan, Theoretical and applied Mechanics, Japan (Vol.53), 111-114.
- 6) A. Aringazin A.K., Dahnovsky Yu., Krevchik V.D., Semenov M.B., Veremyev V.A., Ovchinnikov A. A., Yamamoto K. Two-dimensional tunnel bifurcations with dissipation, *Hadronic Journal.* - 2004, - v. 27, N 2. - P. 115-150
- 7) Yayoi Otsuka, Ken-ichi Hanaki, Jizi Zhao, Ryuuji Otsuka, Kiminori Toyooka, Hiroshi Yoshikura, Tadatashi Kuratsuji, Kenji Yamamoto, Teruo Kirikae, Detection of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin using Quantum Dot immuno-conjugates. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57 (2004) 183-184
- 8) Kenji Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Randomness and organization of the bio-nano-particles into the functional structure. *Theoretical and Applied Mechanics Japan* 53 (2004) 111-114.

##### (総説)

- 1) 星野彰芳、山本健二、カンタムドットナノ粒子を用いた蛍光イメージング素材の開発「医学のあゆみ」2004;210(3);183-186
- 2) 星野昭芳、山本健二 量子ドット蛍光を用いた細菌毒素の1分子抗原抗体反応検出システム *BioClinica*2005;20(1):23-262.
- 3) 山本健二、山屋俊一、「一般細菌以外の

- 培養同定困難な菌」臨床検査データブック2005—2006 高久史監修、医学書院(2005)
- 4) 山屋俊一、山本健二 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査(ノイラミン酸・シアル酸) 日本臨床62(2004)
- 5) 山本健二、「治療技術の進歩」最近の化学工学56:先端医療における化学工学、化学工学会(2004) p1-p8.
- 2 学会発表  
(国内学会)
- 1) 1. 真鍋法義, 星野昭芳, 梁一強, 後藤知将, 加藤規弘, 山本健二 Quantum dotsと薬剤の結合による*in vivo*での効果、日本薬学会第125年会(2005年3月, 東京)
- 2) 二村 泰弘、後藤 知将、山本 健二 アミノ酸からの蛍光物質の水熱合成 化学工学会第70年会(2005年3月、名古屋)
- 3) 星野昭芳、村山研、大川原明子、三浦典子、大野尚仁、安原真人、山本健二、鈴木和男: 血管炎発症に関わる活性化好中球MPO分子の蛍光ナノ粒子による検出 第13回バイオイメージング学会学術集会 京都医科大学(2004年11月)
- 4) 道尊宇遠、二村泰弘、山本健二、河合剛太 RNAの二次構造予測, デザインおよびフォールディングダイナミクスへの新しいアプローチ、第6回日本RNA学会年会(2004年8月、熊本)
- 5) 後藤 知将、二村 泰弘、山口 由岐夫、山本 健二 断熱膨張を用いた亜臨界・超臨界水リアクターによるアミノ酸の縮合反応 化学工学会第69年会(2004年4月、大阪)
- 6) Hoshino A, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Specific recruitment of peritoneal macrophages into perforating ulcers in murine trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. 第34回日本免疫学会総会(札幌, 2004.12)
- 7) Kazumi Omata, Kenji Yamamoto. Theoretical study on the structure of super critical fluids、第54回力学応用講演会(2004年1月東京)
- 8) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto. Applying the principles of chaperons to material designs in nanotechnology applications、第54回力学応用講演会(2004年1月東京)
- (国際学会)
- 1) Kazumi Omata, Yasuhiro Futamura and Kenji Yamamoto, SUPERCRITICAL FLUIDS STUDIED BY MONTE CARLO SIMULATIONS, The 3rd International CIMTEC Conference "COMPUTATIONAL MODELING AND SIMULATION OF MATERIALS" (May, 2004, Acireale, Sicily, Italy).
- 2) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, "Synthesis of Oligopeptide under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling" The 5th Green & Sustainable Chemistry Symposium (Mar, 2005, Tokyo)
- 3) Yasuhiro Futamura, Tomomasa Goto, Kenji Yamamoto, "Prebiotic Biopolymer Synthesis under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling: Volcanic Eruption from Hydrothermal Environment into the Atmosphere" The 1st International Symposium (MISASA-1): Origin Evolution and Dynamics of the Earth (Mar. 2005 Misasa, ToTTori)
- 4) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Yukio Yamaguchi, Kenji Yamamoto, "Reaction of amino acids in a subcritical and supercritical water flow reactor with adiabatic expansion cooling" The 10th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCChE) Congress ( Oct. 2004, Kita-Kyushu)
- 5) Kenji Yamamoto, Toward the cell delivery system with the quantum dots (No. 29-5P10): The 4<sup>th</sup> International Peroxidase Meeting, Oct. 2004, Kyoto, Japan
- 6) Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato

- Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki MPO. Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 4<sup>th</sup> International Peroxidase Meeting, Palulu Plaza Kyoto, Kyoto (2004.10)
- 7) Akiyoshi HOSHINO, Masato YASUHARA, Taeko DOHI, Kazuo SUZUKI, and Kenji YAMAMOTO. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots. 4<sup>th</sup> International Peroxidase Meeting, Palulu Plaza Kyoto, Kyoto (2004.10)
- 8) N. Manabe, A. Hoshino, Y. Q. Liang, T. Goto, N. Kato and K. Yamamoto. Quantum dots conjugated with captopril while remained effect in vivo. The International Society for Optical Engineering (Jan. 2005 U.S.A.)
- 9) A. Hoshino, K. Fujioka, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki, K. Yamamoto. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots. SPIE Biomedical Optics Meeting, San Jose Intl. Convention Center, San Jose, CA (2005.01)
- 10) Kenji Yamamoto, The fluorescence intensity of the quantum dots in the water depends on the surface processing. SPIE Biomedical Optics Meeting, San Jose Intl. Convention Center, San Jose, CA (2005.01)
- 11) Hoshino A, Yamamoto K. Fluorescent Nanocrystal Quantum Dots for Medical Applications 5th International Symposium on Future Medical Engenning based on Bio-Nanotechnology. Tohoku University School of Medicine, Sendai (2005.2)
- 12) Noriyoshi MANABE, Akiyoshi HOSHINO, Yi-qiang LIANG, Tomomasa GOTO, Norihiro KATO and Kenji YAMAMOTO. Quantum dots conjugated with captopril while remained effective in vivo. The Second International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology. Queenstown, New Zealand (Feb. 2005)
- 13) Amane Shiohara, Noriyoshi Manabe and Kenji Yamamoto. Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its characters, The Second International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology. Queenstown, New Zealand (Feb. 2005) .
- 14) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, "Process of Novel Hydrothermal Flow-Reactor with Adiabatic Expansion Cooling: Toward Production of Functional Biopolymer" International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology (AMN-2) Queenstown, New Zealand (Feb. 2005) .
- 15) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto Kazuo Suzuki. 3D-Structural Model Building of LECT2 by Way of a Hybrid Experimental and Theoretical Strategy, GIW, Tokto (Dec. 2004)

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

なし

2) その他なし