

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 本 健 二

平成18（2006）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・部長) 1

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) 半導体ナノ粒子による DDS

山本 健二(国立国際医療センター研究所・部長) 11

2) ヒト血液細胞に対するフローサイトメトリー解析における量子ドットの応用

湯尾 明(国立国際医療センター・血液疾患研究部・部長) 17

3) マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究

狩野 繁之(国立国際医療センター研究所・適正技術開発移転研究部・部長) . 19

4) 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) 21

5) 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) . . 23

6) QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析

鈴木 和男(国立感染症研究所・生物活性物質部・室長) 27

7) 新規半導体ナノ粒子 Si-QD, Ge-QD の細胞毒性

太田 敏博(東京薬科大学・生命科学部・助教授) 36

8) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

山本 悟(国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科・医長) 39

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) 41

3. ナノミセルによる DDS

1) 生物・医療応用 PEG-DET による in vivo 遺伝子導入の試み

斯波 真理子(国立循環器病センター研究所・室長) 45

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) 51

4. 研究協力者

佐々木 有(国立八戸高等専門学校・教諭)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する業績一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷・研究会議・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 69

平成17年度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）
主任者総括研究報告書

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）

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）

山本 悟（国家公務員共済組合栄病院・眼科・医師）

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。その一つ一つ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。本年度は、実際に量子ドットに抗圧剤を結合させ疾患モデル動物を用い動物実験を行った。半減期や局在性が容易に計測できることを確認した。現在、高血圧、消化器疾患、自己免疫疾患、眼科硝子体変性の動物を使った実験を開始している。

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シ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、またこのシステムの評価を動物について初めて行った。

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、その表面加工お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、そこにさまざまな成分を共存させることによって、治療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、そのサイズがウイルス (~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可能としている。

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。ガン治療に於ける薬剤を伝達するシステムは、現在新生血管などからの浸出と貯留による効果 (EPR 効果) を用いるところが大きい。これは、ガン組織がその成長に伴う血管新生が疎な間隙を形成し、そのためこの間隙を 100 nm ほどの粒子を通過することが知られている。現在ガン治療に用いられるミセル型のキャリアーは、この効果を利用して特異的に利用されている。しかしながら、ガン治療以外の疾病にあたっては、疎な間隙を形成する新生血管の EPR 効果を利用することができないため、10 nm 以下することが不可能であるミセル型のキャリアーの応用は不可能となっている。またガン以外の疾病について実際に血管を通じ

て伝達できない場合もあり、その応用について様々な制限や不都合が生じる。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。通常このサイズのも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簡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こっている。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物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。

またさらに安全な量子ドットの開発として現在シリコン量子ドットの開発を行っている。この量子ドットは薬物などと共有結合を作ることが可能であるため安定に体内を巡ることができるため薬物効果などの点で安全性がさらに大きくなることが期待できる。

(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巢腫瘍モデルやヒト前立腺がん骨転移モデルにおけるsiRNAの核酸医薬としての能力を検討する。

(c) ブロック共重合体

近年のウイルスベクターによる副作用の報告から、ウイルスベクターに対する安全性が懸念されている。合成ベクターは、安全性の面からはウイルスベクターより優れるが、特にin vivoでの遺伝子発現効率の低さが、その臨床応用を阻んできたと言える。

我々は、遺伝子導入ベクターとして、カチオン性ポリマーとポリエチレングリコールのブロック共重合体を使用し、DNAとの会合により高分子ナノ粒子を作製し、in vitroおよびin vivoでの遺伝子導入を行ってきた。ポリカチオンとしては、最初

はポリLリジンを用い、遺伝子導入効率を

上昇させることを考慮して、現在は DET (polyaminoethylene aminopropyl aspartamide) を用い、特に in vivo において良好な遺伝子導入、発現効率を示している。昨年度の研究では、PEG-DET を用いたルシフェラーゼ遺伝子の気管内投与により、従来のポリマーに比べて 100 倍程度の遺伝子発現を認めていた。本年度は、これらの遺伝子導入の系を用いて、疾患モデル動物の治療を行い、治療効果の評価を行った。

また化学構造が異なるポリカチオンを合成し、それらの機能について我々が独自に開発した評価法を用いて検討を行い、ベクターの化学構造-機能相関を明確にすることを目的としている。さらには、それらの合成ベクターの細胞内における挙動について様々な検討を行うことで有用な合成ベクターを開発するための基本要件を明らかにすることを目指した。

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) ヒト血液細胞に対するフローサイトメトリー解析における量子ドットの応用
- (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) マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究
- (6) QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析
- (7) 新規半導体ナノ粒子 Si-QD, Ge-QD の細胞毒性
- (8) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

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) 生物・医療応用 PEG-DET による in vivo 遺伝子導入の試み

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 DDS 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、昨年度 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. Shiohara et al., Microbiol. Immunol. 2004)。今年度は、細胞内の核の損傷を計測できるコメットアッセイ法を用いて様々な表面加工についての安定性を評価した。特に本年度開発した表面加工の一つとしてスルホン酸による表面加工について安全性を検討したが前述の MTT アッセイでは、その評価に使用するホルマザンの蛍光とこの新規表面加工による量子ドットの蛍光が重なるため利用できないことが問題であったが、今年度開発したコメットアッセイにより安全性を検討した結果、一昨年に精製方法を開発した 11-メルカプトウンデカン酸より遥かに安全でありまた、蛍光強度も大変強く、バッファー中の塩濃度に対しても安定であることが判明した。

さらに本年度、もう一つの臨床応用として眼科領域に於ける硝子体の病変を検出する方法への応用を開発した。これまでに我々のグループと横浜共済組合病院眼科山本悟医師との共同研究により、量子ドットを利用した豚の眼球の硝子体変成について研究を行っている。従来の染色法では、硝子体を十分に観察できる染色法が開発されていないため、加齢による多くの硝子体変成を見逃して来た。最近、高齢の方が網膜剥離を起し失明するケースがよく報告されている。これらは、硝子体変成が原

因である場合が多いことが知られている。我々が開発した、量子ドットを用いた染色法は、硝子体変成を極めて明確にとらえることが可能である（ヒューマンサイエンス財団TLOにより特許申請中）。これにより、3頭の加齢豚の眼球を用いて従来見えなかった硝子体変成を染色することによる動物実験に成功した。

（2）ヒト血液細胞に対するフローサイトメトリー解析における量子ドットの応用班：

本年度は、ヒト白血球の表面抗原に対するモノクローナル抗体（正確には2次抗体）を量子ドットで蛍光ラベルしてフローサイトメトリーが可能かどうか、従来の蛍光色素に比べて優れているかなどに関して検討した。ヒト末梢血単核球を用いて検討を行った結果、量子ドットレベル2次抗体はPerCPラベル2次抗体と同等以上の性能を有し、リンパ球分画、単球分画においてCD4発現パターンを明らかにすることができた。従って、量子ドットの蛍光標識物質としての高い有用性が示された。

（2）QDを用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析班：

本研究の目的は、半導体ナノ粒子(QD)を用いて、消化管炎症における消化管と他の臓器との細胞交通を解析し、診断・治療のターゲットを探索することである。我々は腹腔由来マクロファージが炎症後及び外科侵襲後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行ってきた。その結果、腹腔マクロファージは炎症刺激により局所に遊走すると同時にケモカインCCL1を産生し、さらにその受容体CCR8のみをケモカイン受容体として特異的に発現するようになるため局所にとどまって細胞塊を形成するというメカニズムが明らかになった。さらに、この現象を、腹膜中皮細胞と腹腔マクロファージの共培養中にCCL1を加えることによって *in vitro* で再現することができ、さらにこの凝集形成をCCL1中和抗体により阻害することができた。この成果により癒着性腹膜炎のメカニ

ズムが明らかになった。

（4）腎疾患治療に向けた DDS 班：腎疾患治療用 DDS としての量子ドット(QD)の可能性を調べる第一歩として、ラット個体における Cd/Se-QD の挙動を調べた。ジヒドロリゴ酸 (DHHLA) で表面修飾した赤色及び緑色 QD、及び各々にラット血清アルブミン (RSA) を結合させたものを調製し、実験に用いた。1 mL の 100 μ M DHHLA-QD 溶液を赤色、緑色の順に尾静脈からラットに投与したところ、赤色 QD 投与後に著変は見られなかったが、緑色 QD 投与直後にラットが死亡した。死亡したラットの膀胱尿には緑色 QD のみが検出され、赤色 QD は検出されなかった。一方、RSA 結合 QD 2 種を同様に順次投与しても、DHHLA-QD の場合と同様、緑色 QD 投与直後にラットが死亡したが、この場合は尿中に QD が検出されず、両色とも血清中に検出された。これらのラット肺における QD の分布を調べた結果、DHHLA-QD、RSA-QD どちらを投与した場合でも、肺の毛細血管に緑色 QD が観察された。以上、高濃度の緑色 QD の投与は肺塞栓の原因となる可能性が示されたことから、DDS への応用に向けて、より安全な QD の開発が必要であると考えられた。

（5）マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究班：

熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼの部分人工抗原ペプチド AD22 を材料として、ポリ乳酸グリコール酸共重合体と乳化させることでナノ粒子を生成することに成功した。本材料がマラリアワクチン DDS の概念の中で、徐放性人工抗原として有用であることを実証した。

（6）QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析班：

血管炎の発症要因の解析と治療法開発

を目的とし、Qdot で標識した myeloperoxidase (MPO)抗体の定量化を昨年度できたことを受けて、本年度は、われわれが開発した血管炎モデルマウスに、Qdot で標識 MPO 抗体(QD-antiMPO)を投与し、MPO 抗体の腎、肺、脾、肝の各組織への集積動態を解析した。また、この動態の *in vitro* での解析のため、マウスの腎臓系球体由来の血管内皮細胞のプライマリカルチャー系を確立した。この内皮細胞を用い、MPO 抗体の結合動態を解析し、ICAM-1 の mRNA 発現および QD-antiMPO が結合した内皮細胞で ICAM-1 の発現ともに増加した。以上から、血管炎発症における MPO 抗体の動態や DDS の *in vitro* での解析に、QD-antiMPO が有用であることを示した。

(7) 新規半導体ナノ粒子 Si-QD, Ge-QD の細胞毒性班：

Si または Ge をコアにした新規半導体ナノ粒子(QD)は、その表面の親水加工にアリルアミンが使われている。アリルアミンは毒性の非常に強い物質であるため、新規 QD の安全性についての知見を集積するため、ほ乳動物培養細胞に対する細胞毒性を調べることを目的とした。Si-QD, Ge-QD(いずれも 50 $\mu\text{mol/mL}$) を 1/1000 (v/v) 量添加した場合には ATP 量の減少は全く見られなかったが、1/200 (v/v) 量添加した場合には ATP 量が半分以下になり、1/100 (v/v) 量添加では細胞がすべて死滅した。したがって 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 以上の濃度では強い細胞毒性があることが判明した。供試サンプル中に遊離のアリルアミンが混在している可能性も考えられたため、透析によって低分子のアリルアミンを除いた精製品について調べた。Si-QD (purify) は 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ で、Ge-QD (purify) は 0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 処理で ATP 量は各々無処理対照の 4%、0.1% となり、透析前のサンプルと同程度の強い細胞毒性が認められた。透析処理が有効でなかった可能性、QD 表面のアリルアミンが細胞内で解離して毒性を示している可能性などが考えられる。いずれにしても表面加工物質に低毒性物質を選択して開発を進めることが重要と判断され

た。

(8) 量子ドットを利用した硝子体可視化の試み：

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たものを透明な眼球硝子体腔に入れることによって量子ドットが持つ蛍光で硝子体を染色し、硝子体の詳細を観察可能なようにするものであり、これによって安全で簡易な硝子体手術も可能となる。これらにより硝子体が引き起す眼疾患の病理の解明や治療法の進歩に貢献することを目指す。

2) アテロコラーゲンによる DDS

我々は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) 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

本研究の目的は、ブロック共重合体から形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの機能評価と細胞に対する作用メカニズムの解析を通して、ベクター設計の最適化を行うことである。前年度までに確立したアミノリシス法により側鎖カチオン構造が異なるブロック共重合体を合成し、培養細胞および細胞スフェロイドに対する遺伝子発現および毒性評価を行ったところ、側鎖にエチレンジアミン構造を有するポリマーにより効率的な遺伝子発現と低毒性を実現できることが確認された。さらに、その細胞内における機能を、細胞による取り込み、細胞内における DNA のリリー

ス、遺伝子導入に伴うハウスキーピング遺伝子の発現変化の観点から評価した。

(2) 生物・医療応用 PEG-DET による in vivo 遺伝子導入班

本研究の目的は、ナノテクノロジーを用いて、種々の機能を搭載した遺伝子導入ベクターを開発し、in vitro および in vivo の遺伝子導入実験を行うこと、さらに遺伝子導入ベクターとしての評価を行い、遺伝子治療の臨床応用の基とすることである。我々は、昨年までの研究で、in vivo において遺伝子発現効率の非常に良好である遺伝子導入ベクター(PEG-DET)の開発に成功している。本年度は、PEG-DET を用いた in vitro および in vivo 遺伝子導入を行った。in vitro では、transfection が困難であった血管内皮細胞やマクロファージ系の細胞でも、遺伝子導入、発現が可能であることを示した。また、in vivo では、動脈硬化症の進展したアポEノックアウトマウスに対して、左心室内投与により、大動脈に特異的に遺伝子の発現を認めた。また、疾患動物モデルを用いて、PEG-DET による遺伝子導入の試みを行い、治療の評価を行った。疾患モデル動物としては、まず、モノクローリン投与によって肺高血圧症を引き起こしたラットを用いた。PEG-DET を用いて気管内よりアドレノメデュリン遺伝子を投与し、その効果をカテーテルによる右室圧測定にて行ったところ、肺高血圧の改善を認めた。合成ベクターを用いた遺伝子導入により、疾患モデル動物の治療に成功したことは、遺伝子治療の臨床応用に向けて、飛躍的な前進をとげたと言える。

C. まとめ

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。

現在我々の製造するCd/Si量子ドットは、昨年度の10倍量を一度に生産することが可能と成り、これは、本研究の初年度の100倍に相当する。またそれ以外

のナノ粒子として今年度Si量子ドット、Ge量子ドットがあらたに開発されこれまでのCd/Si量子ドットにくらべさらに安全性が増すことが期待できる。

安全性についての検討は、昨年度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ていたが(A. Shiohara et al., Microbiol. Immunol 2004)。今年度は、細胞内の核の損傷を計測できる comet assay 法を用いて様々な表面加工についての安定性を評価した。特に本年度開発した表面加工の一つとしてスルホン酸による表面加工について安全性を検討したが前述のMTTアッセイでは、その評価に使用するホルマザンの蛍光とこの新規表面加工による量子ドットの蛍光が重なるため利用できないことが問題であったが、今年度開発した comet assay により安全性を検討した結果、一昨年に精製方法を開発した11-メルカプトウンデカン酸より遥かに安全でありまた、蛍光強度も大変強く、バッファー中の塩濃度に対しても安定であることが判明した。

さらに本年度、もう一つの出口として眼科領域に於ける硝子体の病変を検出する方法への応用を開発した。これまでに我々のグループと横浜共済組合病院眼科山本悟医師との共同研究により、量子ドットを利用した豚の眼球の硝子体変成について研究を行っている。従来の染色法では、硝子体を十分に観察できる染色法が開発されていないため、加齢による多くの硝子体変成を見逃して来た。最近、高齢の方が網膜剥離を起し失明するケースがよく報告されている。これらは、硝子体変成が原因である場合が多いことが知られている。我々が開発した、量子ドットを用いた染色法は、硝子体変成を極めて明確にとらえることが可能である(ヒューマンサイエンス財団TLOにより特許申請中)。これにより、3頭の加齢豚の眼球を用いて従来見えなかった硝子体変成を染色することによる動物実験に成功し臨床への応用が飛躍的に進んでいる。

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
蛍光ナノ粒子を含む眼の硝子体染色剤及び染色方法特許願整理番号 P005HST-30
特願 2006- 13760 発明者 山本悟、山本健二、真鍋法義。星野昭芳

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

半導体ナノ粒子によるDDS

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 法義 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・流動研究員
協力研究者 塩原あまね 国立国際医療センター研究所・客員研究員

研究要旨

量子ドットは、一桁ナノメートルサイズの金属あるいは、半導体ナノ粒子であり、強い蛍光を有し、量子サイズ効果、量子メモリー効果を有する機能粒子である。本研究は、量子ドットなど半導体ナノ粒子を用い、この特性を生かし、生物・医療応用するため、表面加工および表面修飾することを目的とし、特に薬物伝達システムの開発を目的にしている。その結果、薬物療法における副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたってQOLの向上を目指す。またその応用に伴い、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、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。

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。ガン治療に於ける薬剤を伝達するシステムは、現在新生血管などからの浸出と貯留による効果(EPR効果)を用いるところが大きい。これは、ガン組織がその成長に伴う血管新生が疎な間隙を形成し、そのためこの間隙を100nmほどの粒子を通過することが知られている。現在ガン治療に用いられるミセル型のキャリアーは、この効果を利用して特異的に利用されている。しかしながら、ガン治療以外の疾病にあたっては、疎な間隙を形成する新生血管のEPR効果を利用することができないため、10nm以下することが不可能であるミセル型のキャリアーの応用は不可能となっている。またガン以外の疾病について実際に血管を通じて伝達しない場合もあり、その応用について様々な制限や不都合が生じる。

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、1~8nm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。通常このサイズのも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10nm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。

またさらに安全な量子ドットの開発として現在シリコン量子ドットの開発を行っている。この量子ドットは薬物などと共有結合を作ることがかかのであるため安定に体内を巡ることができるため薬物効果などの点で安全性がさらに大きくなることが期待できる。

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、あるいは、今年度合成に成功したシリコンナノ粒子である。これらの粒子は、薬物と結合することを目的としているため、毎回の合成が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することが可能となったため様々な薬物と結合することが可能となった。

2. 薬物との結合

上記のようにして表面加工されたカドミウム・セレン量子ドットは、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。

またシリコン量子ドットは、末端が、 $C=CH_2$ である化合物とSi原子が共有結合を起こし結合する形態となる。そのため薬物とキャリアーとの安定性は極めて強い状態である。

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、昨年度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. Shiohara et al., *Microbiol. Immunol.* 2004)。今年度は、細胞内の核の損傷を計測できる comet assay法を用いて様々な表面加工についての安定性を評価した。特に本年度開発した表面加工の一つとしてスルホン酸による表面加工について安全性を検討したが前述のMTTアッセイでは、その評価に使用するホルマザンの蛍光とこの新規表面加工による量子ドットの蛍光が重なるため利用できないことが問題であったが、今年度開

発したコメントアッセイにより安全性を検討した結果、一昨年に精製方法を開発した11-メルカプトウンデカン酸より遥かに安全でありまた、蛍光強度も大変強く、バッファ中の塩濃度に対しても安定であることが判明した。

さらに本年度、もう一つの出口として眼科領域に於ける硝子体の病変を検出する方法への応用を開発した。これまでに我々のグループと横浜共済組合病院眼科山本悟医師との共同研究により、量子ドットを利用した豚の眼球の硝子体変成について研究を行っている。従来の染色法では、硝子体を十分に観察できる染色法が開発されていないため、加齢による多くの硝子体変成を見逃して来た。最近、高齢の方が網膜剥離を起し失明するケースがよく報告されている。これらは、硝子体変成が原因である場合が多いことが知られている。我々が開発した、量子ドットを用いた染色法は、硝子体変成を極めて明確にとらえることが可能である（ヒューマンサイエンス財団TLOにより特許申請中）。これにより、3頭の加齢豚の眼球を用いて従来見えなかった硝子体変成を染色することによる動物実験に成功した。

D. 考察

1. 達成度について

本研究は、今年度で4年目を終了する。カドミウム・セレン量子ドットの製造法は、その大幅な改善により、当初の100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。現在1日の生産で約1gの製造が可能となった。また、今年度、スルホン酸による新たな表面加工法により、より安全でまた耐酸性、耐塩性に優れた量子ドットの開発に成功した。

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付けることができる。

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）に優れた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。さらに表面加工技術を応用した量子ドットを用い、眼科領域に置いてこれまで確実な方法のなかった硝子体変性の診断・治療を可能とした。高年者の失明の原因となる本疾患に対し大きな福音となり臨床応用が期待できる。

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) Hoshino A, Fujioka K, Manabe N, Yamaya S, Goto Y, Yasuhara M, Yamamoto K. Simultaneous Multicolor Detection System of the Single-Molecular Microbial Antigen with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Microbiol Immunol.* 2005; 49(5): 461-470
- 2) Warner JH, Hoshino A, Yamamoto K, Tilley RD. Water-Soluble Photoluminescent Silicon Quantum Dots *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 44(29): 4550-4554.
- 3) Dawson W, Fujiwara K, Kawai G, Futamura Y, Yamamoto K. A method for finding optimal RNA secondary structures using a new entropy model (vsfold). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2006;25(2):171-89.
- 4) Yasuhiro Futamura and Kenji Yamamoto ; Hydrothermal Synthesis of Olygoglycines with Adiabatic Expansion Cooling, *Viva Origino,* (in press) 2005.
- 5) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Yukio Yamaguchi, Kenji Yamamoto. Condensation Reactions of Amino Acids under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling. *Journal of Chemical Engineering of Japan,* 38, (4) 295-299, April 2005.
- 6) Amane Shiohara, Noriyoshi Manabe, Kazumi Omata and Kenji Yamamoto; Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its characteristics, *Chemical Engineering,* (in press), 2005.

7) Kenji Yamamoto; Nanotechnology and Trends in Drug Delivery Systems with Self-Assembled Carriers. Biomedical Nanotechnology (Ed. By Neelina H. Malsch) Taylor & Francis. 29-40, 2005.

8) Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, E.I. Kudryashov, V.G. Mayorov, M.B. Semenov, V.Ch. Zhukovsky K. Yamamoto; One - dimensional quantum dissipative tunneling in structures with quantum dots, UT Rearch Institute Press, 348-360, 2005.

9) A.K. Aringazin, Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, M.B. Semenov, A.A., V.A. Veremyev, K.Yamamoto; Two-dimensional tunnel correlations with dissipation, UT Rearch Institute Press 2005.

10) A.K. Aringazin, Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, M.B. Semenov, A.A., V.A. Veremyev, K. Yamamoto; Two - dimensional tunnel bifurcations with dissipation, UT Rearch Institute Press 2005.

11) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto; Harnessing the biophysical principles of chaperons to process specialized materials for nanotechnology applications, UT Rearch Institute Press, 434-443, 2005.

12) Kenji Yamamoto ; The fluorescence intensity of the quantum dots in the water depends on the surface processing, UT Rearch Institute Press, 444-450, 2005.

13) Wayne Dawson, Kazuo Suzuki, Kenji Yamamoto; A Physical Origin for Functional Domain Structure in Nucleic Acids as Evidenced by Cross-linking Entropy: I, UT Rearch Institute Press, 451-492, 2005.

14) Wayne Dawson, Kazuo Suzuki, Kenji Yamamoto ; A Physical Origin for Functional Domain Structure in Nucleic Acids as Evidenced by Cross-linking Entropy: II, UT Rearch Institute Press, 493-532, 2005.

(総説)

1

1) 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): 23-26

2) 山本健二、星野昭芳、藤岡宏樹 量子ドットによる薬剤伝達システムとトレーシング技術 *BioIndustry* 2005;22(5):34-40

3) Hoshino A, Nagao T, Murayama K, Ishida-Okawara A, Ito-Ihara, Uno K, Muso E, Miura NN, Ohno N, Naoe S, Tokunaka K, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K. Contribution of Myeloperoxidase on Surface of Neutrophils to Glomerulonephritis Using Nanocrystal Quantum Dots-labeled MPO Antibody. *Kindeny Blood Press Res.* 2005;28(3): 183-184

4) Hoshino A, Fujioka K, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, Yasuhara M, Dohi T, Suzuki K, Yamamoto K. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots *Proc. SPIE* 2005; 5705: 263-271

2 学会発表

(国内学会)

1)塩原あまね、山本健二; 半導体ナノ粒子の生物・医療応用とその安全性, 生体防御機能異常ワークショップ2005(第2回 香川ガレクチンカンファレンス・香川大学機能糖鎖プロジェクト 共催), 2005. 03. 09-10、香川県・高松市

2)山本健二; On the Safety of the Quantum Dots, ナノ学会第3回大会、招待講演、2005.05.08-10, 宮城県・仙台市

3)真鍋法義、星野昭芳、梁一強、後藤知将、加藤規弘、山本健二; In Vivo Study of medicine Conjugated Quantum dots, ナノ学会第3回大会、ポスター発表、2005.05.08-10, 宮城県・仙台市

6)塩原あまね、真鍋法義、山本健二; スルホン酸で表面加工を施したナノ粒子の性格について、ナノ学会第3回大会、ポスター発表、2005.05.08-10, 宮城県・仙台市

7)山本健二; 半導体ナノ粒子の生物・医療応用、遺伝子治療・細胞療法に向けて、第42回臨床分子医学会学術集会、口頭発表、2005.07.22-23, 京都府・京都市

8)山本健二; 量子ドットによるバイオイメージングとその医療応用、平成17年度第1回産学官研究交流会 先端医用・健康研究交流会、2005. 07. 26、岡山県・岡山市

9)尾又一実、山本健二; 「感染症流行の現象論的モデリングとワクチン接種戦略、感染症アウトブレイクの脅威に対処するための数理モデリング」に関するワークショップ

プ、2005. 08. 08、東京都・千代田区

(国際学会)

- 1) Kenji Yamamoto; Self-Assembly of peptide Q-dot nanocrystals, Fourth Multidisciplinary Workshop on Self-Assembly of Peptide and Proteins in Biology, Medicine, Nanomaterials & Engineering, 2005.06.25-28, Crete Greece
- 2) Yu. I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, M. B. Semenov, K. Yamamoto, and E. I. Kudryashov; 1D and 2D Dissipative Tunneling in Structures with Quantum Dots, Quantum Atomic & Molecular Tunneling in Solids and Other Condensed Phases, 2005. 07. 27-31, Santiago de Compostela · Spain
- 3) Fumihiko Takeuchi, and Kenji Yamamoto; Simulation Study Evaluating the Effectiveness of Realistic Vaccination Strategies for Contact Network of Various Degree Distributions, The Second International Symposium on Transmission Models for Infectious Diseases; Preparing for Pandemic Influenza, 2006.01.19-20, Tokyo · Japan
- 4) K. Suzuki, A. Hoshino, and Kenji Yamamoto; Trace of Antibody to myeloperoxidase with nanocrystal quantum dot-labeled antibody recognizing activating neutrophils and in glomerulonephritis and vasculitis inducer candida albicans water-soluble glycoprotein-injected mice, Photonics West, 2006.01.21-26, San Jose · The U.S.A
- 4) A. Hoshino, Y. I. Kawamura, M. Yasuhara, K. Yamamoto, and T. Dohi; Aggregation of Peritoneal Macrophages via CCL1/CCR8 triggers inflammatory and Postoperative Adhesion, Photonics West, 2006.01.21-26, San Jose · The U.S.A
- 5) N. Manabe, A. Hoshino, Y. Liang, T. Goto, N. Kato, and K. Yamamoto; The Measurement of the Concentration of the Quantum Dot Conjugated Medicine Inside the Rat Body, Photonics West, 2006.01.21-26, San Jose · The U.S.A
- 6) S. Yamamoto, N. Manabe, A. Hoshino, and K. Yamamoto; Application of Colloidal Quantum Dots to Visualization of Transparent Vitreous of the Eye at Clinical Situation, Photonics West, 2006.01.21-26, San Jose · The U.S.A
- 7) A. Hoshino, K. Omata, and K. Yamamoto;

Photoinduced Fluorescent Enhancement and Fluorescence micro-oscillation of Quantum Dots I Aqueous Solution, Photonics West, 2006.01.21-26, San Jose · The U.S.A

8) A. Shiohara, N. Manabe, and K.; Novel Surface Processing with Sulfonic Acid for Quantum Dot and its Characteristics, Photonics West, 2006.01.21-26, San Jose · The U.S.A

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

なし

2) その他なし

ヒト血液細胞に対するフローサイトメトリー解析における量子ドットの応用

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長
協力研究者 佐伯 久美子 国立国際医療センター研究所室長
協力研究者 小柳 真 国立国際医療センター研究所研究生

研究要旨 本年度は、ヒト白血球の表面抗原に対するモノクローナル抗体（正確には2次抗体）を量子ドットで蛍光ラベルしてフローサイトメトリーが可能かどうか、従来の蛍光色素に比べて優れているかなどに関して検討した。ヒト末梢血単核球を用いて検討を行った結果、量子ドットレベル2次抗体はPerCPラベル2次抗体と同等以上の性能を有し、リンパ球分画、単球分画においてCD4発現パターンを明らかにすることができた。従って、量子ドットの蛍光標識物質としての高い有用性が示された。

A. 研究目的

量子ドットは、その強力かつ持続的な蛍光を発することで、様々の蛍光ラベルが必要な場面において有用と考えられている。例えば、モノクローナル抗体を蛍光標識する際の新しい標識物質としての用途が想定されている。また、細胞（マクロファージ、など）をラベルして体内動態を追求できる系も検討されている。

本年度の研究においては、ヒト白血球の表面抗原に対するモノクローナル抗体（正確には2次抗体）を量子ドットで蛍光ラベルしてフローサイトメトリーが可能かどうか、従来の蛍光色素に比べて優れているかなどに関して検討したので報告する。

B. 研究方法

量子ドットは、カドミウムセレンを骨格としたものを用いた。

ストレプトアビジン付加量子ドット、ビオチン付加抗マウスIgG抗体、所定のマウスモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。今回は、モノクローナル抗体は抗ヒトCD4抗体を用い、BD社製FACSCaliburによってフローサイトメトリーを行った。

量子ドットの他の蛍光物質としては、PerCPを用いて、上記と同様に抗体をラベルして、量子ドットと比較した。

フローサイトメトリーの対象とする細胞は、今回は、ヒト末梢血単核球（主にリンパ球と単球）を用いた。ヒト末梢血からの単核球分離は通常の比重遠心法によった。

C. 研究結果

量子ドットもしくはPerCPで蛍光ラベルした抗ヒトCD4モノクローナル抗体を用いて、ヒト末梢血単核球のCD4抗原の膜発現について検討を行った。

ヒト末梢血単核球をFSCとSSCによって2次元に展開すると3つの領域に分画することができた。FSCとSSCが何れも低値の領域には血小板などが、FSC中等度高値でSSC低値の領域にはリンパ球が、FSCとSSCの何れも高

値の領域には単球が存在した。

次に、CD4発現量に関して、量子ドットラベル抗体をFL4で、PerCPラベル抗体をFL3で、それぞれ定量した。その結果、何れの場合も血小板分画ではCD4が低発現、リンパ球分画ではCD4は高発現と低発現の2相性、単球分画では中等度発現となった。全体的に見て、量子ドットラベルの蛍光強度が強い傾向にあった。

D. 考察

今回の検討によって、量子ドットラベル抗体によるフローサイトメトリーが問題なく行えること、しかも、従来の優れた蛍光物質よりも更に蛍光強度が強いことが証明された。今後は、様々の蛍光を指標とする測定系において量子ドットの有用性が確認されて、その用途が広がってゆくものと期待される。

E. 結論

量子ドットラベル2次抗体と抗ヒトCD4モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーを、ヒト末梢血単核球分画を用いて行い、PerCPラベル2次抗体と同等以上の測定結果を得ることに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. Am J Physiol Endocrinol Metab 289:E419-E428,2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし