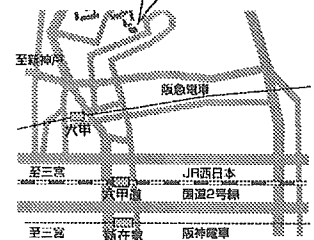
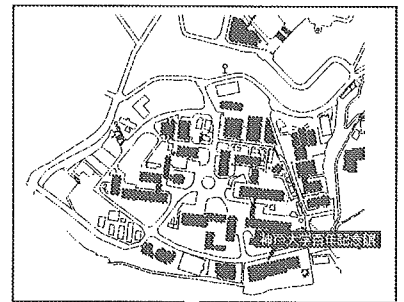
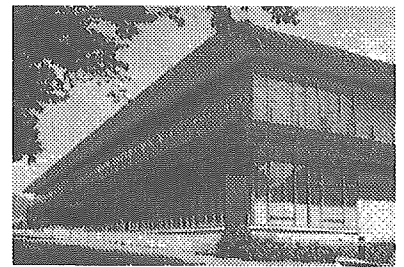


# Qドットの 生物医療応用と その安全性



**International Symposium on Colloidal  
Quantum Dots for Biomedical Applications  
and Their Safety**

**Saturday 26 November 2005, 10:30  
Rokko Hall located in KOBE University  
Centennial Hall, Kobe, Hyogo, Japan**

## Organizers

Kenji YAMAMOTO (International Medical Center of Japan)  
Akihiko KONDO (Kobe University)  
Richard TILLEY (University of Wellington, New Zealand)  
Kazuo SUZUKI (National Institute of Infectious Diseases)

## Opening Remark

Kenji Yamamoto (International Medical Center of Japan)

## Preparation of quantum dots

Yukio Yamaguchi (University of Tokyo, Graduate School of Engineering)

## New approach of quantum dots

Akihiko Kondo (Kobe University, Graduate School of Science and Technology)

## New approach of quantum dots

Tadafumi Adschiri, Takashi Naka, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu  
(Tohoku University, Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials)

## Synthesis of silicon nanoparticles for biomedical applications

Richard Tilley (University of Wellington, New Zealand)

## Quantum dots with silica shells

Thomas Nann (Albert-Ludwig University Freiburg, Germany)

## The safety of the colloidal quantum dots

Toshihiro Ohta (Tokyo University of Pharmacy and Life Science)

## Quantum dots tagged medicine

Noriyoshi Manabe (International Medical Center of Japan)

## Immune cell tracing using quantum dots

Akiyoshi Hoshino (International Medical Center of Japan)

## An application of quantum dots in ophthalmology

Satoru Yamamoto (Yokohama Sakae Kyosai Hospital)

## Estimation of the development of the RPGN by the quantum dots

Kazuo Suzuki (National Institute of Infectious Diseases)

共催 財団法人医療機器センター、社団法人化学工学会、日本ハイオイメージング学会

お問い合わせ・申し込み先:

近藤昭彦 (神戸大学大学院自然科学研究科: naomio3@kobe-u.ac.jp)  
山本健三 (国立国際医療センター研究所: ikazuyuki@ri.ilmc.go.jp)

**入場無料**

## Preparation of Quantum dots

Yukio Yamaguchi  
Department of Chemical System Engineering,  
The University of Tokyo

### ABSTRACT

The preparation of quantum dots, which are nanoparticles, for medical diagnostic applications consists of several nano-processings such as synthesis, surface modification, and fixation of nanoparticles. Several types of nanoparticles such as semi-conductor, metal, oxide, magnetic, phosphor and carbon are introduced. There are a lot of problems for medical applications: (1) the size control of nanoparticles is necessary, (2) surfactant must be selected for anti-aggregation, (3) the surface of nanoparticles must be modified for bio-related diagnostics, (4) the fixation method of nanoparticles on a substrate or a particle must be considered.

In nano-processing, self-organization is a crucial concept for fabricating nanoparticle devices for medical applications. The combination of a top down method and a bottom up method is necessary for device fabrications. The nano-materials and nano-processings will be discussed in terms of nano-structures.

## Bionanoparticles for pinpoint delivery of genes and drugs

Akihiko Kondo and Masaru Muraoka

*Department of Chemical Science and Engineering*

*Kobe University, Rokkodaicho 1-1, Nada, Kobe 657-8501 Japan*

Gene therapy is recognized as one of the most promising cures for many diseases such as cancer. Many attempts using virus vectors have been made for delivering genes to various cells in human. While these gene therapies have shown noticeable efficacy, it has turned out that nonspecific introduction of genes into undesired cells and organs causes deleterious side effects. More importantly, the virus vector-derived DNA may induce unexpected effects on human.

Hepatitis B virus (HBV) is a human liver-specific DNA virus, whose genome harbors three overlapping envelope (env) genes in a single open reading frame, encoding S, M (pre-S2 + S), and L (pre-S1 + pre-S2 + S) proteins. In the last decade, the recombinant HBV env S and/or proteins were produced in yeast cells as particles and used as the immunogen for the new generation HB vaccines that were proven to be safely applicable to human.

We previously succeeded overproduction of the HBV env L particles in yeast cells. In the present studies, the L particles have been purified, characterized (1), and examined for the applicability to the gene delivery system (2). To examine the L particles as gene carriers, a mammalian expression plasmid for GFP (green fluorescence protein) was incorporated into L particles by electroporation. The L particles containing the plasmid were added to the culture medium of human hepatoma HepG2 cells. After two days, more than 90% of the HepG2 cells expressed GFP, while the control non-human liver cells did not. Then, the nude mice transplanted with human hepatoma HuH-7 cells and human colon cancer WiDr cells were injected intraperitoneally with the L particles containing the plasmid. Two weeks later, the fluorescence was observed specifically in the HuH-7 cells, but neither in the WiDr cells nor in the liver, spleen, kidney, and intestine of the mice. Because the L particle is an empty vesicle containing no viral DNA, it can be used as a safe and efficient vector for human liver-specific gene transfer. Genetically engineered L particles that are able to target to various organs were constructed by deleting the hepatocyte binding domain of L protein (pre-S region) and displaying targeting peptide or protein ligands such as dimer of Z domain (ZZ domain) and single chain variable fragment (scFv), etc. In the ZZ domain displaying particles, displayed ZZ bound antibodies, and hence particles showed the antibody mediated specificity. We have confirmed the antibody-mediated introduction of calcein into cells

### References

- 1) T. Yamada *et al.*, *Vaccine*, **19**, 3154 (2001)
- 2) T. Yamada *et al.*, *Nature Biotechnol.*, **21**, 885 (2003)

## Supercritical Hydrothermal Synthesis of Quantum Dots

Tadafumi ADSCHIRI

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials,  
Tohoku University

We have developed supercritical hydrothermal synthesis method of nanoparticles. Hydrothermal synthesis reaction to synthesize metal oxide from metal salt aqueous solution proceeds extremely high rate above critical point of water (374 C), which the solubility of metal oxide produced reduces significantly. In the method, metal salt aqueous solution is mixed with high temperature water to rapidly increase the temperature of the metal salt solution and thus achieved extremely high supersaturation degree, with reducing the reactions and crystallizations during the heating up period. By using this method, we succeeded in the continuous and rapid production of metal/metal oxide single crystals of nano meter. Specific feature of this method is 1) single nano crystal formation, 2) morphology control, and 3) oxidizing/reducing atmosphere by introducing oxygen/hydrogen gas due to homogeneous phase formation.

Recently, we proposed a new method to synthesize organic-inorganic-bio-molecule fused materials. At a supercritical condition, organic molecules are miscible with water, and water molecule works as an acid or base catalyst for organic chemical reactions. Both batch and flow experiments were conducted by using tube bomb reactors. By introducing organic species (aminoacids, carboxylic acids, amines, alcohols, aldehydes etc.) for supercritical hydrothermal synthesis, nanoparticles whose surface was modified with organic materials were synthesized. We succeed in synthesizing surface modified metal oxide nanoparticles (several nm to 20 nm), for variety of metal oxides. Modification of bio-materials including amino acids or peptides is also possible. Morphology, crystal structure and particle size could be controlled by the in-situ surface modification of nanoparticles. This surface modification allows the nanoparticles to disperse in aqueous solution, and possibly be tagged by targeting bio-molecules, including antibody. We have tried to fused single strand DNA and a enzyme (*EcoR I*) on the surface modified nanoparticles as a preliminary experiment.

## Silicon and Germanium Quantum dots

Dr Richard Tilley

School of Chemical and Physical Sciences, Victoria University of Wellington

Research in the field of semiconductor nanocrystals synthesized in solution has been intense since the formation of cadmium selenide quantum dots by Murray et al 1993 [1]. One of the most promising applications for quantum dots formed in the liquid phase is as biological imaging chromophores. Silicon quantum dots have intense luminescence throughout the visible spectrum due quantum confinement as first reported in porous silicon by Canham [2]. Silicon and germanium quantum dots offer the possibility of less toxic replacements to organic dyes in biological imaging when compared to cadmium selenide quantum dots [3].

Silicon and germanium nanocrystals have been synthesized in micelles using powerful hydride reducing agents and a number of surfactants. The effect of the surfactant and reducing agent on the size of the silicon nanoparticles and the size distribution will be discussed with a focus on the achievement of uniform sized silicon nanocrystals with sharp emission in the visible region. Particle sizes have been ascertained by transmission electron microscopy and UV-Vis absorption and photoluminescence spectroscopies.

For biological applications control of the surface character of the nanocrystals is essential. The surface of the silicon and germanium particles produced have been modified to produce hydrophobic and hydrophilic particles by reaction with either with 1-heptene or allylamine respectively. FTIR spectra show the surface modification of the particles by 1-heptene or allylamine. The hydrophobic particles have been used in subsequent investigations as bio-imaging agents in cells [4-5].

### References

- [1] C.B.Murray, D.J.Norris and M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, *115*, 8706.
- [2] L. T. Canham, *Appl. Phys. Lett.* 1990, *57*, 1046.
- [3] A. M Derfus, W. C. M. Chan and S. N. Bhatia, *Nano Letters* 2004, *4*, 11.
- [4] J. H. Warner, A. Hoshino, K. Yamamoto, R. D. Tilley "Water-soluble photoluminescent silicon quantum dots " *Angewandte Chemie*, "VIP" vol 44, 4550–4554, 2005.
- [5] R. D. Tilley, J. H. Warner, K. Yamamoto, I. Matsui and H. Fujimori, Micro-emulsion synthesis of monodisperse surface stabilized silicon nanocrystals, *Chem. Commun.*, 1833–1835, 2005.

## Quantum dots with silica shells

Masih DARBANDI, Thomas NANN\*

Freiburg Materials Research Centre (FMF), Albert Ludwig University Freiburg, Stefan-Meier-Straße 21, D-79104 Freiburg, Germany

\*Email: thomas.nann@fmf.uni-freiburg.de

The application of semiconductor nanocrystals (so called “Quantum Dots”) for bioanalytical or medical purposes requires a subsequent surface derivatisation. Additional surface layers should increase the brightness of the nanocrystals by saturation of surface defects, and the chemical stability by prevention of photooxidation. Furthermore they should render the Quantum Dots biocompatible and coupleable to biomolecules. Silica is a promising surface material, since it is transparent, chemically inert and not permeable for voluminous molecules like biomolecules. A major drawback includes the difficult preparation of such silica shells on hydrophobically ligated nanocrystals.

Three different methods for the preparation of silica shells on semiconductor nanocrystals with respect to biomedical applications are presented: First, an adaption of the “classical” Stöber-method; second, a new microemulsion-based synthesis method, and third, a chemisorption/reaction method for preparation of very thin silica layers. With the Stöber-method, the surface of the luminescent nanocrystals is firstly “activated” and the nanoparticles are subsequently transferred to a polar medium. Therein, silica shells with average diameters of about 30 nm can be grown by means of a sol-gel process.<sup>1</sup> Major problems with this method are homonucleation of silica and a relatively fixed size of the resulting particles.

The surface derivatisation with silica can be performed very elegantly by means of a microemulsion synthesis: Hydrophobically ligated nanocrystals are dispersed within the oil-phase and silica precursors are dissolved in the water-phase. The nanocrystals undergo a spontaneous phase-transfer with subsequent silica growth on addition of a base catalyst. The resulting nanoparticles can be prepared within a size range from approximately 20 nm diameters up to some 100 nm.<sup>2</sup> They are very monodisperse and “smooth” compared to those prepared with the Stöber-method.

Some biological/medical applications require an extremely thin surface layer (e.g. FRET applications). A chemisorption/reaction method was developed to prepare such very thin – almost monolayered – silica shells.<sup>3</sup> Even though this method is very difficult to be realized, the resulting nanoparticles show excellent biocompatibility and stability.

Finally, some bioanalytical examples for applications of silica-shelled Quantum Dots will be presented and briefly discussed.

---

<sup>1</sup> T. Nann, P. Mulvaney, Einzelne Quantenpunkte in SiO<sub>2</sub>-Schalen, *Angew. Chem.* 2004, 116, 5511-5514; T. Nann, P. Mulvaney, Single Quantum Dots in Spherical Silica Particles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 5393-5396.

<sup>2</sup> M. Darbandi, T. Nann, Single Quantum Dots in Silica Spheres by Microemulsion Synthesis, *Chem. Mater.* 2005, 17, 5720-5725.

<sup>3</sup> J. Riegler, P. Nick, U. Kielmann, T. Nann, Visualizing the Self-Assembly of Tubulin with Luminescent Nanorods, *J. Nanosci. Nanotech.* 2003, 3(5), 380-385.

## The Safety of the Colloidal Quantum Dots

Toshihiro OHTA

Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Safety evaluation of quantum dots (QD) was investigated with a genotoxicity test and a cytotoxicity test using cultured mammalian cells. Genotoxic potential of CdSe/ZnS-core/shell quantum dots coated with 11-mercapto-undecanoic acid (QD-COOH) and their ingredients such as 11-mercaptoundecanoic acid (MUA), ZnS, and trioctylphosphine oxide (TOPO) were evaluated with comet assay using human lymphoma WTK1 cells *in vitro*. Cells were treated with test compound for 2 hr. Treated cells were embedded in 1% agarose gel on a slide and placed in a chilled lysing solution (pH10) for 60 min. DNA unwinding and electrophoresis was conducted under chilled alkaline condition of pH13. The slides were then neutralized and stained with ethidium bromide. The length of the whole comet (migration) was measured for 50 nuclei for each dose and differences between the means in treated and control cells were statistically analyzed. Crude QD-COOH sample was positive at dose ranges of 100  $\mu\text{g/ml}$  or more, while purified QD-COOH sample was negative in the comet assay. MUA but not TOPO and ZnS caused strong DNA-damaging effect, suggesting the possibility that MUA is responsible for the positive response in the comet assay of QD-COOH. Other QD samples coated with 2-aminoethanethiol (QD-NH<sub>2</sub>) or  $\alpha$ -thioglycerol (QD-OH) were not genotoxic.

Since purified QDs are expected to be non-genotoxic, we then investigated their cytotoxicity with cultured Chinese hamster CHL cells by measuring cellular ATP contents. ATP was assayed using a luciferin-luciferase method. Neither Cd/Se-QD-NH<sub>2</sub> nor Si-QD-NH<sub>2</sub> showed cytotoxic effect up to a dose of 500  $\mu\text{g/ml}$ . Pre-irradiation of QDs with UV for 1 hr did not affect on cytotoxicity.

## Quantum dots-tagged medicine

Noriyoshi MANABE

Research Institute, International Medical Center of Japan

Photo-luminescent semiconductor quantum dots (QDs) are expected to be applied for medical purposes by taking advantage of the fluorescence. A conventional tracer for injected medicines, such as radioisotopes, can be replaced by QDs, because the radioisotopes have the risk of radiation damage and are prohibitively expensive. Moreover, radioisotope tracing methods can trace the drug at organ level but not within the organs. In the present work, we propose that QDs can play an additional role, *i.e.*, they are used for controlling beneficial effects of medicines. For this purpose, we conjugate (2S)-1-[(2s)-2-Methyl-3-sulfanylpropionyl] pyrrolidine-2-carboxylic acid (captopril) with the quantum dots. Captopril has the effect as an anti-hypertension drug, which inhibits angiotensin 1 converting enzyme. We conjugated the quantum dots with captopril by the exchange reaction avoiding the regions that holds the medicinal effect. Quantum dots conjugated with captopril (QD-cap) were three times brighter than thioglycerol-coated quantum dots (QD-OH). The particle size of captopril was 1.1nm and that of QD-cap was 12nm. QD-cap was permeated into the HeLa cells, while 11-mercaptoundecanoic acid (MUA)-coated quantum dots (QD-MUA) were taken into the HeLa cells by endocytosis. In addition, no apoptosis was detected against the cells that permeated QD-cap, because there was no damage to DNA. These results indicated that QD-conjugated medicines (QD-medicine) could be safe in the experiment on the level of the cell. Next, we investigated the inhibition against angiotensin 1 converting enzyme (ACE) *in vitro*. We found that the QD-cap inhibits the activity of ACE *in vitro* to almost the same extent as the pure captopril. *In vivo*, the reduction of the blood pressure of the experimental hypertensive model rats was observed. During the 30 minutes after the injection, the rate of the reduction is comparable with that of the reduction by the pure captopril, whereas the blood pressure was found to increase during the following 30 minutes. The concentration of the QD-cap in the blood was measured by using the standard curve of the fluorescence intensity. The measurement showed that the concentration decays exponentially and the half-life is 0.65 hours. This estimation is in consistent with the above-mentioned reduction time of the blood pressure when the QD-cap was used. In addition, the fluorescence of the QDs allowed us to find that the QD-cap accumulates in a section of the liver, lung and spleen. These results suggested that QD-medicine were effective on the animal level. And, QD-medicine enabled us to analyze the tracing and localization of the captopril quantitatively and chronologically *in vitro* and *in vivo*. The fluorescence of QDs revealed the dynamics and kinetics of QD-medicine inside the body.



## Immune cells tracing using quantum dots

Akiyoshi Hoshino<sup>1,2</sup>, Kouki Fujioka<sup>1</sup>, Yuki I. Kawamura<sup>3</sup>, Noriko Toyama-Sorimachi<sup>3</sup>, Masato Yasuhara<sup>2</sup>, Taeko Dohi<sup>3</sup>, and Kenji Yamamoto<sup>1,2\*</sup>

1 Department of Medical Ecology and Informatics, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan

2 Department of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Hospital Pharmacy, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

3 Department of Gastroenterology, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan

Fluorescent nanoparticles, such as nanocrystal quantum dots (QDs), have potential to be applied to molecular biology and bioimaging, since some nanocrystals emit higher and longer lasting fluorescence than conventional organic probes do. Here we report an example of labeling immune cells by QDs. We collected splenic CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte and peritoneal macrophages from mice. Then cells were labeled with QDs. QDs are incorporated into the T-lymphocyte and macrophages immediately after addition and located in the cytoplasm via endocytosis pathway. The fluorescence of QDs held in the endosomes was easily detected for more than a week. In addition, T-lymphocytes labeled with QDs were stable and cell proliferation or cytokine production including IL-2 and IFN- $\gamma$  was not affected. When QD-labeled T-lymphocytes were adoptively transferred intravenously to mice, they remained in the peripheral blood and spleen up to a week. Using QD-labeled peritoneal macrophages, we studied cell traffic during inflammation on viscera in peritoneum cavity. QD-labeled macrophages were transplanted into the peritoneum of the mouse, and colitis was induced by intracolonic injection of a hapten, trinitrobenzenesulfonic acid. With the aid of strong signals of QDs, we found that macrophage accumulated on the inflammation site of the colon. These results suggested that fluorescent probes of QDs might be useful as bioimaging tools for tracing target cells *in vivo*.

## Application of Quantum Dots in Ophthalmology

### Application of Colloidal Quantum Dots to Visualization of Transparent Vitreous of the Eye at Clinical Situation

Satoru Yamamoto

Yokohama Sakae kousai Hospital Department of Ophthalmology

There is no adequate method to observe transparent vitreous at daily clinical situation. Triamcinolone acetonide is used on special case, that is for improvement of Diabetic Macular Edema or for surgery of vitreous (vitrectomy). But some side effects (elevation of Intraocular pressure, acceleration of cataract, and endophthalmitis) have been reported.

Whereas recently many eye diseases are known to be connected with pathologic and/or physiological changes of the vitreous. Liquefaction of vitreous by aging may participate in Retinal Tear which may lead to Retinal Detachment then to No Light Perception. Some Macular Edema may be related to vitreous traction to Macula. Epiretinal Membrane is thought to be connected with posterior vitreous after liquefaction. Therefore it is required to develop new vitreous visualizing method for ophthalmologists to observe the pathogenesis of vitreous.

And in case of vitrectomy ( a operation to cut and eliminate the vitreous ), it has difficulty and hazard to perform the operation to transparent vitreous. Triamcinolone Acetonide is visible particle, then it is difficult to visualize subtle change of vitreous at vitrectomy.

To visualize the transparent vitreous, we use aqueous colloidal quantum dots (ACQD). 0.1 ~ 0.15 ml of ACQD is injected into vitreous cavity of enucleated porcine eye with 27 gauge needle by way of pars plana of the ciliary body. ( Aging porcine eyes and young porcine eyes were used.) Afterwards observation of vitreous with slit lamp microscopy is done. And moreover, vitrectomy of the eye was performed.

Just after injection of ACQD, it dispersed into vitreous cavity. Fluorescence emitted from ACQD reflected the structures of vitreous and it was observed by slit lamp microscopy without difficulty. Consequently details of status of vitreous were detected. A subtle aging vitreous change , that is Weiss Ring in front of optic disc was observed easily. And in case of vitrectomy, transparent vitreous was changed into translucently dyed target. It simplified and secured the vitrectomy definitely.

We hope this Quantum Dots Vitreous System could be put to practical use as soon as possible.

# Estimation of the development of rapid progressive glomerulonephritis (RPGN) by the Quantum Dots

Kazuo Suzuki

Dept. of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases,  
Tokyo (ksuzui@nih.go.jp)

We examined the role of myeloperoxidase (MPO) and antibody to MPO in the pathogenesis of glomerulonephritis associated with MPO-specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (MPO-ANCA) in SCG/Kj glomerulonephritis mice using nanocrystal quantum dots (QDs). QDs have been recently applied to molecular biology because of their greater and longer fluorescence and becoming widely used in biotechnology and medical applications. QDs have several advantages over organic fluorophores with regard to high luminescence, far long stability against photobleaching, and a range of fluorescence wavelengths from blue to infrared depending on the particle size. In the present study, we demonstrated the QD-conjugated anti-recombinant murine MPO (rmMPO) Ab visualized the expression of MPO on the neutrophil surface after stimulated with FMLP, whereas not observed without stimulation. Notably, QD-conjugated anti-rmMPO Ab realized MPO translocation on neutrophil surface in SCG/Kj mice showing spontaneous crescentic glomerulonephritis without any stimulation. Moreover, simultaneous administration of anti-rmMPO Ab with *Candida albicans* water-soluble glycoprotein (CAWS) significantly promoted the severe collapse of glomeruli in C57BL/6 mice, and QD-labeled anti-rmMPO Ab were accumulated on the neutrophils infiltrated into collapsed glomeruli, but not CAWS with non-immunized IgG. Furthermore, blood flow in kidney surface vessel was significantly decelerated in SCG/Kj mice and CAWS-exposed anti-rmMPO Ab-treated mice, suggesting that CAWS and anti-rmMPO Ab may cause damage in blood vessel continuing the formation and development of glomerulonephritis. These results indicate that surface-expressed MPO on the activated neutrophils with anti-rmMPO Ab may coordinately play essential roles in the initial steps for the development of glomerulonephritis in mice. As well, we observed that QD-MPO Ab recognized MPO translocation to surface of neutrophils in patients with RPGN without any stimulation, suggesting that MPO translocated on the surface of a patient with RPGN may be certain to contribute to the development of glomerular lesion.

## 平成 17 年度 半導体等 DDS 班会議

日時： 平成 18 年 2 月 2 日(木) 12 時 30 分～17 時 00 分

場所： 国立国際医療センター研究所 B 棟地下 1 階 中会議室

司会 山本健二(国際医療セ研究所・副所長)

12 時 30 分～13 時 00 分

13 時 00 分～13 時 15 分 はじめに 山本健二

13 時 15 分～13 時 30 分 落谷孝広(国立がんセンター研究所・がん転移研究室)  
「アテロコラーゲンナノ粒子による siRNA の全身投与の検討」

13 時 30 分～13 時 45 分 近藤昭彦 (神戸大学工学部)  
「ピンポイントドラッグデリバリーを目指したバイオナノ粒子の開発」

13 時 45 分～14 時 00 分 斯波真理子(国循・研究所バイオサイエンス部)  
「高分子ナノ粒子による in vitro および in vivo の遺伝子導入」

14 時 00 分～14 時 15 分 土肥多恵子 (国際医療セ研究所・消化器疾患研究部)  
「QD を用いた in vivo 細胞トラフィックの解析」

14 時 15 分～14 時 30 分 (休憩)

14 時 30 分～14 時 45 分 名取泰博 (国際医療セ研究所・臨床薬理研究部)  
「腎疾患治療に向けた DDS」

14 時 45 分～15 時 00 分 切替照雄 (国際医療セ研究所・感染/熱帯病研究部)  
「量子ドットの感染症への応用」

15 時 00 分～15 時 15 分 狩野繁之 (国際医療セ研究所・適正技術開発・移転  
研究部)  
「マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究」

15 時 15 分～15 時 30 分 湯尾 明 (国際医療セ研究所・血液疾患研究部)  
「血液疾患 DDS」

15 時 30 分～15 時 45 分 片岡一則(東京大学大学院工・医)  
「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」

15 時 45 分～16 時 00 分 鈴木和男 (国立感染症研究所・生物活性物質部)  
「QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析」

16 時 00 分～16 時 15 分 太田敏博(東京薬科大学 生命科学部)  
「

16 時 15 分～16 時 30 分 山本 悟 (横浜栄病院・眼科)  
「硝子体変性と量子ドット」

16 時 30 分～16 時 45 分 山本健二 (国際医療セ研究所・副所長)  
「量子ドットによる DDS」

16 時 45 分～17 時 00 分 来年度に向けて 山本健二

## アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS

分担研究者 落谷孝広  
(国立がんセンター研究所がん転移研究室)

siRNA をベースにした核酸医薬による治療を現実のものとするためには、生体内での急速な分解と失活に耐え、生体内の目的の細胞へ的確に送り届ける DDS 技術が要求される。本研究班でのこれまでの研究では、まずこの siRNA やアンチセンスオリゴヌクレオチドとアテロコラーゲンのナノ複合体の正常を明らかにするとともに、ヒト精巣腫瘍担がんマウスや炎症性皮膚炎の動物モデルへ投与した場合の体内動態や治療効果についての詳細を検討してきた。本年度は、ヒト前立腺がん細胞の骨転移モデルマウスを用いて、アテロコラーゲン/siRNA のナノ粒子の全身性投与についての実際の効果を検討した。ナノ粒子による siRNA の抑制効果は、ルシフェラーゼによる in vivo イメージング技術を用い、腫瘍での遺伝子発現の抑制や転移巣の増殖をリアルタイムに評価した。まず siRNA のナノ粒子は正常の組織にも到達したが、がん組織にはその 1.7 から 2.2 倍の量がデリバリーされ、さらに正常組織からは siRNA のほとんどが 5-7 日で消失するのに対し、腫瘍組織では 60% が残存していた。また転移巣の腫瘍における遺伝子発現抑制効果は 90% 以上に達し、さらに転移腫瘍そのものの増殖も 4 週間以上に渡って抑制した。以上の結果は、アテロコラーゲン・ナノ粒子が siRNA の全身性のデリバリーキャリアとして有用であることを示している。

(2005 アテロ関連文献)

- 1) Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, et al. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102: 12177-12182.
- 2) Research Highlight, RNA interference delivers, *Nature*, 2005, 436: 892.
- 3) Saito S, Honma K, Kita-Matsuo H, et al. Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput functional analysis. *Physiol Genomics*. 2005, 22: 8-13.
- 4) Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, et al. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int J Oncol*, in press.

## ピンポイントドラッグデリバリーを目指したバイオナノ粒子の開発

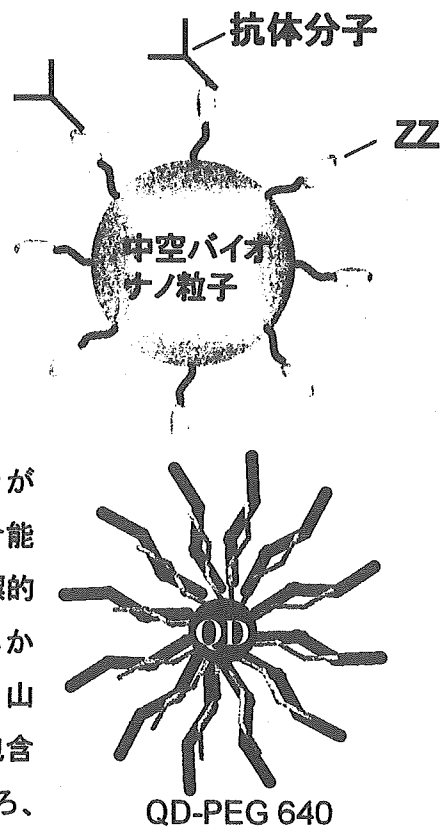
近藤 昭彦

(神戸大工・応用化)

遺伝子治療並びにドラッグデリバリーの分野において、標的臓器のみへのデリバリー（ピンポイントデリバリー）が非常に重要な課題となっている。このことは副作用の低減といった点で患者のQOLの改善に大きな意味を持つと考えられる。我々はピンポイント遺伝子及び薬剤デリバリーを目指し、新規ベクターであるB型肝炎ウイルス表面抗原粒子に関する研究を行っている。この粒子は、ウイルスゲノムを除去した中空バイオナノ粒子であるため、粒子内に薬剤を封入し、静脈注射によってヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入できることが期待される。また、酵母を用いて大量生産も可能である。既に、この粒子を用いたヒト肝細胞へのターゲティングに成功している。そこで、より適用範囲を拡大するために、肝細胞以外のさまざまな細胞へも導入可能な粒子の開発について検討した。このために、今回は、ヒト肝細胞への認識部位を削除した欠失変異導入粒子に、各種リガンドを導入して新たな特異性を付与した粒子の作製を行った。

具体的にはB型肝炎ウイルスのLタンパク質を遺伝子改変し、3種類の欠失変異導入タンパク質(Δ21-153, Δ33-153, Δ50-153)並びに、これらの決失部位にZZ(抗体結合ドメイン)を挿入したZZ提示タンパク質の発現プラスミドを構築した。中でもΔ50-153にZZを挿入した粒子は高い発現量を示すことが分かった。このZZ挿入Δ50-153を精製し、抗体結合能を調べた結果、この粒子は抗体を特異的に結合し、標的細胞へのターゲティングが可能であることが明らかとなった。さらに、水分散型の量子ドット(QD-PEG640 山本先生より分与)をこのZZ提示バイオナノ粒子に包含させて抗体特異的なターゲティングを試みたところ、標的細胞への量子ドットの特異的な導入が可能であることが明らかとなった。

また、改変型粒子によっては酵母での生産が難しい場合もあることから、昆虫細胞を用いた生産系の確立も行った。



## PEG-DET による in vivo 遺伝子導入による疾患モデル動物の治療

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部 斯波真理子  
東京大学大学院工学系研究科 片岡一則

[背景]我々は、循環器疾患に対する新しい遺伝子治療法として、高分子ナノ粒子を用いた遺伝子導入の試みを行っている。ポリカチオンとポリエチレングリコールのブロック共重合体と DNA を結合させた高分子ナノ粒子は、ポリエチレングリコールの長さ、ポリカチオンの種類、ポリカチオンと DNA とのチャージ比などの条件を最適化することにより、in vitro および in vivo での遺伝子導入、発現効率が増大することを報告してきた。昨年は、骨格となるポリマーを PEG-DET を用いることにより、in vivo において著明な発現を認めることを報告した。今回は、疾患モデル動物として、アポ E ノックアウトマウスおよびモノクロタリン投与肺高血圧モデルラットに対し、PEG-DET を用いた治療実験を行った。

[方法]アポ E ノックアウトマウスに対し、マウスアポ E 遺伝子を PEG-DET を用いて気管内投与により、遺伝子導入を行い、経時的に採血を行った。さらに、肺をホモゲナイズして RNA を精製し、RT-PCR を用いてマウスアポ E mRNA の発現量を測定した。Wister ラットにモノクロタリンを腹腔内投与して 3 週間おき、心臓カテーテルを用いて右室圧を測定し、肺高血圧症モデルが作製されていることを確認した。さらに、PEG-DET を用いてラットアドレノメデュリンを気管内投与して、2 日後に再度右室圧を測定し、効果判定を行った。

[結果]アポ E ノックアウトマウスに対し、PEG-DET を用いてアポ E 遺伝子の導入を行ったところ、3 日後、7 日後に総コレステロール値の有意な低下を認め、14 日後には前値に戻った。低下を認めたのは、主に VLDL 分画であるが、LDL 分画でも有意な低下を認めた。HDL 分画では、有意な変化を認めなかった。アポ E 遺伝子導入の 2 日後に肺を取り出し、マウスアポ E の mRNA 量を測定したところ、Wild Type マウスの約 10 分の 1 量の遺伝子発現を認めた。肺高血圧モデルラットに対し、PEG-DET を用いてアドレノメデュリン遺伝子の導入を行ったところ、右室圧の有意な低下を認めた。

[考案]疾患モデル動物に対し、PEG-DET を用いた遺伝子導入が有用であることが証明された。また 1 歩、臨床応用へ近づいたと考えられる。

厚生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究 分担研究

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

分担研究者 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

協力研究者

河村由紀 消化器疾患研究部 協力研究員

星野昭芳 医療生態学研究部 流動研究員

本研究の目的は、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することによる診断・治療のターゲットの探索である。代表研究者らはこれまでに腹腔由来マクロファージ(mφ)が炎症後及び外科手術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 mφ 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。今年度は、この現象を、腹膜中皮細胞と腹腔 mφ 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。この実験系は、これまでにない腹膜癒着の *in vitro* モデルであり、独自のスクリーニング系である。さらに、CCL1 抗体は、炎症による腹膜癒着及び開腹手術後の癒着形成のいずれのモデルにおいても顕著な阻害効果が認められ、CCL1/CCR8 相互作用が、慢性炎症や術後の腹膜癒着防止のための標的となりうるということが明らかとなった。腹膜癒着阻害剤のマーケットは非常に大きく、医療サービス面からのニーズも高い。また、腹膜癒着の防止により再手術が減少し、術後の症状が緩和されれば、医療経済的な貢献も期待される。



## 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)

糸球体腎炎や糖尿病性腎症などの進行性の腎疾患における DDS の標的として、糸球体や尿細管間質の細胞が考えられる。我々はこれまで、半月体性糸球体腎炎の動物モデルに対するステロイド治療において、ある種の塩基性リポソームが糸球体指向性の DDS として有効であることを示した。すなわち、ポリエチレングリコール及び新規塩基性脂質・TRX-20 を適度な密度で有するリポソームは *in vitro* でメサングウム細胞や線維芽細胞に選択的に結合し、これにステロイド剤を内封させてラット半月体性糸球体腎炎モデルに投与すると、糸球体に集積してフリーのステロイド剤と比べて低用量で治療効果を示した。一方、糸球体腎炎や糖尿病性腎症の進展には尿細管上皮細胞を介した間質の病変が深く関与すると考えられており、尿細管間質病変の進展抑制も慢性糸球体疾患における腎不全阻止に有効な手段となることが示唆されている。従って尿細管上皮細胞を標的とした DDS は腎疾患治療に有用と考えられるが、同細胞への選択的 DDS は未だ開発されていない。

尿細管上皮細胞は原尿中の様々な分子を再吸収する機能を有する。例えば、ラットに尾静脈投与されたオリゴデオキシヌクレオチドは、糸球体を通過し、近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜にて再吸収されて、同細胞に蓄積することが知られている。従って糸球体を通過する大きさの半導体ナノ粒子(QD)の表面に適当な分子を配置すれば、近位尿細管上皮細胞への DDS として利用できる可能性が考えられる。そこで今年度は、尿細管上皮細胞への DDS として半導体ナノ粒子が有用であるかどうかを調べる基礎実験として、2種類の大きさの QD を尾静脈投与してその動態を調べた。

QD として、dihydrolipoic acid (DHLLA) で表面加工した QD と、それにラット血清アルブミン(RSA)を結合させたものを調製した。DLS 法により測定した QD の平均サイズは、緑色 DHLLA-QD が 10 nm 程度、赤色 DHLLA-QD、緑色 RSA-QD、赤色 RSA-QD はいずれも 20-30 nm であった。またラット尿に QD を加えてその検出限界を調べたところ、赤色及び緑色の QD はいずれも 1  $\mu\text{M}$  まで検出可能であった。

4 週令の正常ラット(Wistar 系、雄、100 g)に、100  $\mu\text{M}$  の QD 溶液 1 mL を赤色、緑色の順に尾静脈投与した。赤色 QD 溶液を投与しても、ラットに変化は見られなかったが、緑色 QD 溶液を投与したところ、ラットは1分以内に死亡した。この現象は、RSA 加工の有無にかかわらず起きた。そこで直ちにラットより膀胱尿、血液及び腎などの臓器を摘出し、分析に用いた。

RSA 結合 QD は赤色、緑色いずれも血液中にのみ検出され、尿中には検出されなかった。一方、緑色 DHLLA-QD は尿中に検出され、赤色 DHLLA-QD は尿中、血液中のいずれも検出限界以下であった。腎においては、赤色 RSA-QD は糸球体や尿細管周囲の毛細血管に検出され、血液に見られたことと一致した。緑色 RSA-QD は腎にほとんど検出されなかった。また DHLLA-QD 投与ラットの腎においては、赤色は尿細管周囲毛細血管と思われるところに弱く検出され、緑色は腎髄質の尿管と思われる部位に強く検出された。以上の結果から、RSA-QD は短い時間では糸球体で濾過されずに血液中に留まるが、緑色 DHLLA-QD は速やかに糸球体を通過して尿中に出現することがわかった。また DHLLA-QD 及び RSA-QD を投与したラットの共通の所見として、肺への緑色 QD の蓄積が観察されたことから、これがラットの死因である可能性が考えられた。

今後、DDS としての QD を利用するにあたり、この死因を詳細に調べるとともに、動物個体中において安定かつ安全な QD の調製が必要と考えられる。

## ナノテクノロジーを駆使した血液学領域における研究

国立国際医療センター研究所血液疾患研究部 湯尾 明

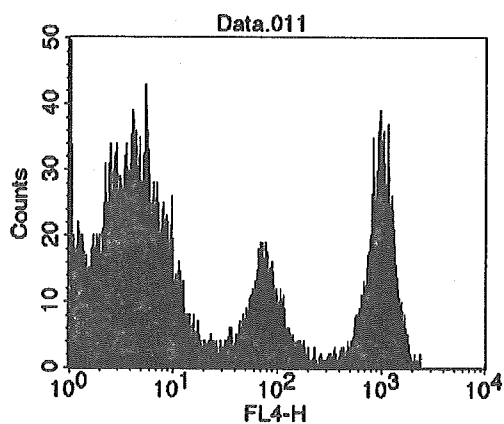
血液学領域においては、ナノテクノロジーに関する研究は大きく遅れている。我々は、従来よりナノ分子による遺伝子導入を試みているが、血液細胞に対する導入効率の改善はなかなか実現されていない。また、細胞内に導入されたように見えても細胞膜に囲まれたエンドゾーム内に閉じこめられたままで、リソソームと融合して消化されるか、細胞外に排泄されてしまう。

このような状況の中で、ただ1つ遺伝子導入効率の飛躍的な改善をもたらしたのが、ヌクレオフェクターというエレクトロポレーション機器である。このほかに、ウイルス由来ペプチドなどを用いて、研究を進める予定である。

細胞の側の新たな系としては、ヒト血液細胞（株）のほかに、サルES細胞、さらには、ヒトES細胞を用いた研究を行う予定であるが、ヒトES細胞に関しては、文部科学大臣の確認を取得した範囲の実験に限定される。無血清、無フィーダー環境におけるES細胞の未分化維持培養を安定化させて、遺伝子導入などのナノテクノロジーを駆使した実験を行いたい。

その他、受容体ナノテクノロジー（あるいは抗体ナノテクノロジー）に属する分野の研究も行ってきた。新しい受容体に対するモノクローナル抗体の作成、抗体ラベル蛍光分子としての量子ドット、など、現在進めている研究の一端を紹介する。

量子ドットラベル抗体によるFACS



## 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

東京大学大学院工学系・医学系研究科 片岡一則

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。

本研究では、当研究室で独自に確立したアミノリシス法を利用して、効率的な遺伝子発現と低毒性を実現するブロック共重合体 PEG-DET を合成した。PEG-DET は、マウス骨芽細胞などの初代培養細胞に対し、細胞毒性を惹起することなく効率的な遺伝子導入を実現した。さらに、PEG-DET と分化誘導因子を発現するプラスミドから調製されたコンプレックスをボーンセメントと混合し、マウス骨欠損部位に移植したところ、遺伝子導入による骨再生を確認することができた。PEG-DET は、in vivo 遺伝子治療に応用可能な遺伝子ベクターシステムとして今後、様々な展開が期待される。

一方、全身投与による遺伝子・siRNA デリバリーを実現するためには、血流中においては安定であるが、細胞内環境で選択的に内包遺伝子および siRNA を放出するシステムの構築が望まれる。そこで本研究では、細胞内の還元的環境下で選択的に開裂するジスルフィド架橋で安定化された高分子ミセルを開発した<sup>1)</sup>。その結果、全身投与において、ミセルの血中滞留性の向上が確認され、肝実質細胞に一様な遺伝子発現を惹起することができた。さらに、本システムは、凍結乾燥することが可能であり、再溶解後も粒径や遺伝子発現効率が変化しないことが確認され、実用化に向けて極めて優れた特性を有することも明らかとなった。

さらに、本年度は、光によって遺伝子導入部位を制御できる新しい遺伝子キャリアを開発した。本システムでは、光照射により、細胞毒性を惹起することなく、遺伝子発現効率を 100-200 倍に上昇させることに成功した。さらに、遺伝子キャリアをマウス結膜下に投与後、レーザー光を照射することで、光照射部位のみに遺伝子導入した蛍光蛋白質(YFP)の発現を確認することができた<sup>2)</sup>。本システムは、in vivo 実験で、光照射により遺伝子導入部位を制御することに成功した世界で初めての研究成果である。

1) K. Miyata, K. Kataoka et al., *J. Controlled Release* **109**: 15-23 (2005).

2) N. Nishiyama, K. Kataoka et al., *Nature Materials* **4**: 934-941 (2005)

## 硝子体変性と量子ドット

国家公務員共済組合連合会 横浜栄共済病院 眼科

山本 悟

我々は、量子ドットを用いて眼の硝子体を染色し、硝子体の生理的・病理的变化を容易に把握できる方法を研究している。

多くの眼科的疾患は硝子体の変化に関係しているため、硝子体の状態を正確に把握することは重要である。しかし、硝子体は、本来透明であるため硝子体自体や、その変化を視認することが困難である。

そこで、我々は量子ドットを眼の毛様体扁平部にあたる強膜から27ゲージの針で硝子体腔に注入して、硝子体を染色する方法を考案した。

この方法によって、微細な硝子体構造の視認が容易にできるだけでなく、硝子体手術に応用することで、より正確で安全な手術が可能になると思われる。

これから、この方法が普及することによる眼科学の進歩も期待している。