

高感度ナノ粒子によるナノDDSとがん標的外科治療に関する研究

（分担）研究者 武田 元博 東北大学大学院工学研究科

（分担）研究者 亀井 尚 東北大学病院

（分担）研究者 甘利 正和 東北大学病院

（分担）研究者 仲田 栄子 東北大学保健学科

研究要旨

機能性ナノ粒子を用いた分子イメージングによる革新的な医療を実現すべく、新規開発した高感度計測装置・材料を用いた計測を中心として以下のテーマについて研究を行った。

- ①. 高感度計測を可能とするナノサイズマーカーの開発：本研究で開発したシリカコーティングヨウ化銀ビーズの体内動態並びに安全性試験を行った。また、MRI造影剤としてガドリニウムナノ粒子の作製に成功した。シリカコーティング金コロイドの作製・X線CT撮影に成功した。
- ②. 生体における腫瘍マッピング技術：高効率X線、MRIナノマーカー結合抗腫瘍抗体を用いた腫瘍の分子標的マーキングによる高感度蛍光観察法の開発：抗腫瘍抗体と量子ドット結合物の生体内における非特異的結合を抑制する最適なコーティング材料の検討を行った。その結果、高分子PEGが現時点で最良の材料と考えられ、今後検討を行うこととなった。また、担癌マウス生体内の詳細な蛍光色素分布を検出するための装置として実体顕微鏡を開発すべくその仕様について検討を行い、拡大率は2-20倍、蛍光視野と肉眼視野の2つを備える顕微鏡を試作することとした。

A 研究目的

薬物治療の発達した現在のがん治療においても、外科的切除はいまだに有力な治療法である。近年の臓器温存手術は腫瘍の発生臓器そのものおよび、機能温存のため、腫瘍を含めた部分切除が様々な臓器に対して行われている。しかし腫瘍の進展によっては、浸潤など必ずしも肉眼的に見て腫瘍と正常組織の境界が明らかでない場合が多く、時として完全切除が困難となる。外科的切除によって腫瘍を完全に切除するためには腫瘍の可視化

が不可欠である。そのためには従来の医学的手法では行い得なかった方法が必要となる。本研究では、特に社会的に緊急性の高いがん診断・治療の革新的技術開発を目指し、がんのナノDDS・生物時計の関与を含めたin vivoにおけるナノからマクロレベルの新たな診断・治療法の開発、医療応用を目的とする。

近年、特異な構造、機能を持つナノ粒子は多くの分野での応用が試みられている。特に医学薬学分野では、これまでにない医療の実現が期待される。しかしナ

ノ粒子の多くは、安全性がいまだに確立されておらず、体内動態も完全には明らかにされていないのが実状である。

ゆえに、本研究は蛍光ナノ粒子を用いた生体内単分子イメージングを試み、乳がんをモデルとした、がん病変の可視化による新しい外科治療を開発するとともに、ナノ粒子の体内動態の解明や安全性の確立に向けた研究を行う。

B 研究方法

上記目的のため、高感度ナノ粒子作製グループと共に、X線ナノマーカーとして既に開発したナノサイズヨウ化銀ビーズについて、体内動態を明確化し、蛍光計測により病巣を可視化する上で不可欠な、深部にある蛍光色素を検出する技術の開発に取り組む。ナノ粒子安全性・体内動態検討グループ（武田、粕谷、小林芳、甘利、亀井、仲田）、高感度蛍光検出グループ（亀井、甘利、小林正、武田）がそれぞれ下記項目について研究を行った。

1. ナノサイズヨウ化銀ビーズの体内動態の解明と安全性試験（武田、亀井、甘利、小林芳、仲田）：ナノサイズヨウ化銀ビーズを静脈内投与し、CTを経時的に撮影、撮影後各臓器を摘出、透過型電子顕微鏡（TEM）で肺、肝、脾、腎、心、血液、胆汁、尿を観察し、ナノサイズヨウ化銀ビーズの局在について検討した。さらに、種々の量のヨウ化銀懸濁液を静脈内投与し、それぞれの死亡率からラットにおける安全投与量を検討した。

また、新たな造影剤として、ガドリニウム、および金コロイドを用いてナノサイズシリカコーティング粒子を作製し、それぞれMRI、X線造影剤としての造影効果を検討した。

2. 腫瘍可視化による新しい外科手術の開発（武田、甘利、亀井、小林正ら）：悪性腫瘍に対する外科治療の基本は完全な切除である。そのため、従来の悪性腫瘍に対する手術は腫瘍病巣に正常組織をある程度つけた状態で切除して完全な切除を目指す。しかし、時に悪性腫瘍は肉眼には見えない浸潤によって周囲に拡がり、肉眼的に切除し得たと判断しても、病理診断で断端陽性となることもしばしばである。このように肉眼で切除範囲を決定するには精度の限界があり、近年求められているテーラーメイドメディスンの遂行のために手間と時間をかけても病理診断が欠かせないものとなっている。手術の段階で病理診断に匹敵するがんの検出方法があれば手術時間の短縮だけでなく、病理医の負担も軽減することができる。そのためには腫瘍を微細なレベルまで可視化する必要がある。ほとんどの腫瘍は体表より深部に存在しているため、腫瘍のマーキングには蛍光法が有力な方法である。しかしながら従来の蛍光計測法は最も蛍光の強い量子ドットを用いた場合でも深部方向の計測限界が1cm程度であり、臨床応用を阻むひとつの要因であった。生体に蛍光計測を行うに当たって病巣は必ずしも計測表面に存在するわけではないので、深部に存在する蛍光色素を検出する新たな技術が必要である。

我々は超音波変調蛍光検出法の開発に取り組み、水槽にイントラリピッドと蛍光標的を入れた模擬生体を用い、その深部にある蛍光色素の検出実験を行った。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ、動物実験による有効性、安全性の検証が主目的である。動物を用いた実験はすべて全身麻酔下に行っており苦痛を伴うものではない。また本研究における動物実験計画は本学の動物実験委員会に実験計画書を提出し、認可されている。

C 研究結果

1. ナノサイズヨウ化銀ビーズの体内動態の解明と安全性試験（武田、亀井、甘利、小林芳、仲田）：ヨウ化銀ビーズの体内動態について、ラットにヨウ化銀ビーズを静脈注射直後、X線CTで撮像して造影効果を確認した後、安楽死させ、各臓器を摘出して透過型電子顕微鏡でヨウ化銀粒子の分布を観察した。その結果、投与直後は肺、肝、腎、脾臓とも血管内のヨウ化銀ビーズを確認できたが、その後は肝細胞にのみ取り込みが見られ、それ以外の臓器にヨウ化銀ビーズは認められなかった。（Breast Disease, 2006; 日本外科学会, 2006）

新たなMRI造影剤として、まずStober法によりガドリニウム内包シリカコーティングビーズの作製を試みた。さらに、金コロイドを同様にシリカコーティングした。ガドリニウム内包シリカコーティングビーズはMRIで撮像し、水と比較して造影効果を確認した。

また、金コロイド内包シリカコーティングビーズについては、X線CTを用いて水と比較し、造影効果を確認した。ガドリニウムナノコロイドの作製に当たって、ガドリニウムはコロイドを形成し難いため、シリカナノ粒子を作製し、その表面にガドリニウムをコーティングしてガドリニウムナノ粒子を作製した。その上に更にコーティングすると、ガドリニウムと水プロトンとの距離が遠くなるため、当初は最大の造影効果を得るため、表面にガドリニウムが露出した状態で造影剤として使用することとした。MRIを用いてT1強調画像を撮影したところ、水に比べて高強度の信号を発することがわかった（図1）。金コロイド造影剤についてもX線CTにて水に比較して増強効果を認めた。

2. 腫瘍可視化による新しい外科手術の開発（武田、甘利、亀井、小林正ら）：

1) 鏡視下手術における蛍光検出法の開発；鏡視下手術は患者に無用な侵襲を与えない手術方法として知られ、センチネルリンパ節生検とともに今後の外科治療の中心になっていくと考えられる。現在センチネルリンパ節生検は、様々ながん手術への応用が試みられている。我々はこれまでセンチネルリンパ節生検に最適な波長と粒子サイズの検討を行い、蛍光波長は近赤外光、粒子サイズは40nmが妥当であることを発表してきた（Nakajima, Cancer Science, 2005）。今回、量子ドットを用い、ブタをモデルとして腹腔内センチネルリンパ節検出に成功した。現在従来から行われる色素法や、有機系蛍

光色素との比較を行っている。量子ドットはきわめて高い発光効率、耐久性を持ち、医療用蛍光材料として期待される。

2) 超音波変調蛍光検出法の開発；蛍光計測による診断技術の開発には現時の深部限界である、1cmを超える必要がある。我々は小林正らとともに模擬生体を用いた計測を行い、30mm程度の深部蛍光色素の計測に成功した(小林正の報告書で詳述)。

D 考察

我々の研究の目的は、高感度ナノ粒子の開発と医療応用である。機能性ナノ粒子を用いた高感度計測法を確立するに当たって、可能とするナノ粒子の医療応用にはそれらの計測に必要な、ブレイクスルーとなる基盤計測技術の開発はもちろんのこと、ナノ粒子の体内動態・排泄経路の明確化、安全性の確立も欠かすことはできない。本年は既に開発したナノ粒子の生体内動態、排泄経路、安全投与量について特に集中して研究を行った。

以下、個々の項目について考察した。

1. ナノサイズヨウ化銀ビーズの体内動態の解明と安全性試験(武田、亀井、甘利、小林芳、仲田)：これまでシリカコーティングヨウ化銀ビーズが造影剤として有用であることを示してきたが、今回はじめて各主要臓器におけるシリカコーティングヨウ化銀ビーズの存在を、TEMにより観察し得た。その結果、従来の造影剤に比べ長期にわたって造影効果を持続し、数日後に排泄されることがわかった。排泄経路として、胆汁排泄が関与すると考えられ、腎排泄は否定的な結果を得た。また血管内では凝集等も起こら

ず、短時間では血栓形成等の重大な障害も観察されなかった。したがって、シリカコーティングヨウ化銀ビーズは長時間造影効果を維持したい病変の描出に有効であり、がんの場合EPR (extended permeability and retention)効果によって腫瘍に長時間にわたって蓄積、造影効果を維持することが期待される。

現在の問題として、従来の造影剤に比べてCT値が低く、造影効果がやや不足なことが挙げられる。今後さらにヨウ化銀の濃度を上げるなどの改善策が望まれるが、濃度を上げた場合、凝集などの問題が生じやすくなることから、種々の凝集を防ぐ工夫も同時に行う必要がある。

Litchfield-Wilcoxon法により、シリカコーティングヨウ化銀ビーズのLD₅₀はヨウ化銀として、74.2mg/kgと推定された。

以上、シリカを含めナノ粒子コーティング技術はナノテクノロジーの行く末を決める重要な技術であることから、今回体内分布・動態が示された意義は大きい。しかし詳細な臓器分布はICP法など、定量検出法を行う必要があり、現在ICP法による解析を進めている。

今回、現在の医療において有用な画像診断法であるMRIの造影剤として、ガドリニウムナノ粒子の作製に初めて成功した。現段階で水に比べて高信号を発することはわかっているが、造影効果や安全性確認を今後行う必要がある。また、ガドリニウムが露出した状態で造影剤として用いるのは安全面で問題のある可能性があるため、さらにシリカコーティングを行い、その際の造影効果の変化を確認する必要がある。シリカコーティング

金コロイドは今後、シリカコーティング
ヨウ化銀ビーズと共に新たなX線造影剤
としてその有用性、安全性について検討
を行う予定である。また今後随時動物実
験を行い、これらの有効性を検証して行
きたい。

2. 腫瘍可視化による新しい外科手術の開
発（武田、甘利、亀井、小林正ら）：今
回、高感度ナノ粒子の開発のみならず、
初めて従来の蛍光計測の計測限界である
1cm以上の深さの蛍光色素の検出に成功
した。本方法はセンチネルリンパ節の検
出に有用なだけでなく、蛍光色素でマ
ーキングした腫瘍組織の検出にも大きく
貢献し、腫瘍を完全に切除し得る精密な
外科手術法を確立する上で欠かせない技
術と言える。現在の装置は試作機である
ため、今後更に改良を重ね、生体で使
用し得る装置を作製したい。

E 結論

本研究の結果、ヨウ化銀ビーズの体内
動態が初めて明らかにされた。ナノ粒子
の体内動態は医療を中心とした生体応
用に不可欠な研究であり、今後の医療
応用に向けて、大きな弾みになると考
えられる。また、深部に存在する蛍光
色素の検出を可能とする技術の開発は、
蛍光計測の医療応用を進める上で極
めて重要な意義を持つ。ナノ物質の
生体に対する安全性確保はナノメ
ディシンを円滑に実現する上で最も
重要であり、慎重かつ的確に行なわ
なければならない。

F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対

としたものではないため、健康に対する
害は生じない。

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohuchi N, Takeda M, Nakajima M, Sakurai Y, Kawai M, Ishida T, Higuchi H. Application of nanotechnology for breast cancer research: Nano-DDS and molecular imaging based on visualization of single particle in vivo. Breast Disease 2006; 25: 47-47.
- 2) Takeda M, Kobayashi Y, Sakurai Y, Cong L, Ishida T, Suzuki A, Amari M, Ohuchi N. Detection of Sentinel lymph nodes by novel MR contrast media. Breast Disease 2006; 25: 47-47.
- 3) Sakurai Y, Takeda M, Kawazoe Y, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei T, Nakajima M, Ohuchi N. Nanosized silver iodide beads as new contrast media for sentinel lymph node navigation surgery. Breast Disease 2006; 25: 55-56.
- 4) Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Takeda M and Enomoto M. Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. Applied Physics Letter 2006; 89: 1811022.

- 5) 大内憲明、武田元博、石田孝宣、手術と放射線、山田章吾編「早期のがん治療法の選択 放射線治療」、金原出版株式会社、46-51、2006。
- 6) 中島護雄、武田元博、大内憲明。蛍光ナノ粒子による癌センチネルリンパ節検出とナノ医療の展望。日本機械学会誌2006年2月 小特集号「医療工学-工学による医療の再編-」2006 ; 109 (1047) : 90-92。
- 7) 桜井 遊、武田元博、小林芳男、中島護雄、亀井 尚、粕谷厚生、川添良幸、大内憲明、新規ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いた造影効果と X 線センチネルリンパ節生検への応用。乳癌基礎研究 2006 ; 16 : 43-47。
- 8) 武田元博。医工連携のための技術者再教育プロジェクトー医学からみたー。日本機械学会誌 2006 年 2 月、小特集号「医療工学 -工学による医療の再編-」2006 ; 109 (1047) : 104-105。
- 9) 樋口秀男、渡邊朋信、多田寛、武田元博、大内憲明。バイオナノイメージングとナノ医療。応用物理 2006; 75(6):695-698。
- visualization of single particle in vivo. 25th Congress of the IABCR, Montreal, September 2006.
- 2) Takeda M, Kobayashi Y, Sakurai Y, Cong L, Ishida T, Suzuki A, Amari M, Ohuchi N. Detection of Sentinel lymph nodes by novel MR contrast media. 25th Congress of the IABCR, Montreal, September, 2006.
- 3) Sakurai Y, Takeda M, Kawazoe Y, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei T, Nakajima M, Ohuchi N. Nanosized silver iodide beads as new contrast media for sentinel lymph node navigation surgery. 25th Congress of the IABCR, Montreal, September 2006.
- 4) Sakurai Y, Takeda M, Kawazoe Y, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei T, Amari M, Cong L, Ohuchi N. NANOSIZE SILVER IODIDE BEADS AS NOVEL CONTRAST MEDIA AND THEIR IN VIVO DISTRIBUTION The 8th International Symposium of Medical Engineering Based on Bio-nanotechnology, Singapore, December 2006.
- 5) Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Enomoto M, Takeda M, Fluorescence Tomographic imaging using the Ultrasound Tagging Technique. The 9th International Conference on Optics within Life Sciences, Taipei, Taiwan, November 2006.

2. 学会発表

(国際会議)

- 1) Ohuchi N, Takeda M, Nakajima M, Sakurai Y, Kawai M, Ishida T, Higuchi H. Application of nanotechnology for breast cancer research: Nano-DDS and molecular imaging based on

- 6) Y. Kobayashi, K. Misawa, M. Takeda, N. Ohuchi, A. Kasuya, M. Konno, Control of Shell Thickness in Silica-Coating of AgI Nanoparticles The 4th International Conference on Advanced Materials (ICAMP-4), Hamilton, New Zealand, December 2006.
- 4) 清水直樹、小林芳男、武田元博、大内憲明、今野幹男。X線造影用AgI/SiO₂コア-シェル型複合粒子の合成。第8回化学工学会学生発表会、一関、2006年3月。
- 5) 水本喬、武田元博、榎本幹、小林正樹。音響光学効果を利用した生体計測のための超音波タグ蛍光イメージング法。第61回応用物理学会東北支部学術講演会、仙台、2006年12月。

(国内会議)

- 1) 桜井 遊、武田元博、小林芳男、中島護雄、亀井 尚、粕谷厚生、川添良幸、大内憲明。新規ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いた造影効果と体内動態の検討。第106回日本外科学会定期学術集会、東京、2006年3月。
- 2) 武田元博、中島護雄、小林芳男、小林正樹、桜井遊、亀井尚、叢莉蔓、甘利正和、粕谷厚生、石田孝宣、鈴木昭彦、大内憲明。機能性ナノ粒子を用いたセンチネルリンパ節イメージング第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月
- 3) 桜井 遊、武田元博、小林芳男、中島護雄、亀井 尚、粕谷厚生、川添良幸、大内憲明。新規ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いたセンチネルリンパ節の造影効果と体内動態の検討。第14回日本乳癌学会学術集会、金沢、2006年7月。

II. 知的財産権の出願登録状況

(国内特許) ; 該当なし

(国外特許) ; 該当なし

PDT 応用のための光線感作物質の吸収スペクトル高精度計算

（分担）研究者 川添 良幸 東北大学金属材料研究所 教授

（分担）研究者 水関 博志 東北大学金属材料研究所 助教授

研究要旨

赤外領域に吸収スペクトルをもつ材料は幅広い病気の診断と治療応用として期待されている。その腫瘍が皮膚に近いときだけでなく、内部にあるものにも有効である。本研究では癌光線力学治療に有効な材料であるポルフィリン、フタロシアニン基錯体の正確な吸収スペクトル計算を行った。

A はじめに

がん治療におけるPDT (photo dynamic therapy)では光線感作物質と酸素と光だけが必要である。多くの病気、ボーエン病やカポジ肉腫はレーザーまたは光によって光線感作物質を活性化しPDTにより治療が可能である [1]。PDTは通常の手術よりも侵襲性がなく、ほかの治療よりも副作用が少ない。PDTはすでに行われた治療であり、そのため制御可能である。それは繰り返しが可能であり、放射線治療とは異なる。またPDTは脳手術のようなときに残った腫瘍細胞を殺す目的で通常の手術の予防手段として使われる。

ポルフィリンとその誘導体は光線感作物質として良く知られ、現在の治療では癌の光線力学治療として使われている。特定の光吸収剤のもっとも高い効率を実現するためにレーザー励起波長にできるだけ近いフタロシアニン誘導体を見いだ

すことが必要である。そのためフタロシアニンの吸収特性を正確に予測することは計算化学の観点からも重要である。

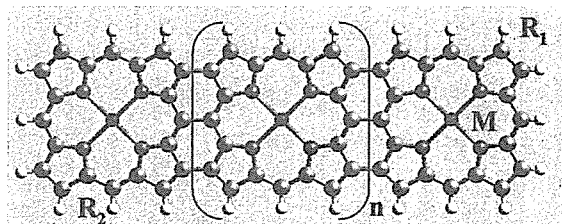


Fig. 1. Structure of porphyrin array.

ポルフィリン基錯体の光線感作物質はとても強い吸収帯（ソーレー帯）を近紫外領域（ $\sim 400\text{nm}$ ）にもつため、光線力学治療をしている患者は薬剤が体内に残っている間は日光を避けなくてはならない。将来の癌治療におけるPDTは赤外領域で有効に働く光吸収剤が必要となる。赤外領域の光はもっとも体内の奥までとどき、健康な細胞には有害ではない。最近、Fig. 1に示す長く、剛直なテープ状のポルフィリンオリゴマーが合成された [2]。このオリゴマーは吸収スペクトルが赤外領域

までシフトすることが測定されている。この性質はPDT癌治療には都合がよい。そのため、高い溶解度をもち、必要な吸収スペクトルをもつ分子構造の設計が重要となる。

B 計算方法

すべての分子構造は密度汎関数理論 (DFT) と半経験的手法により求めた。用いた DFT と基底は B3LYP、BLYP、PBE1PBE と 6-31G(d) である。様々な溶媒効果は Tomasi の polarized continuum model (PCM) を用いて、溶媒としてはシクロヘキサン、ベンゼン、塩化メチレン、ジメチル・スルホキシドを用いた。すべての計算で振動数解析を行い、安定構造であることを確認した。DFT で得られた構造は時間依存密度汎関数理論の計算にも用いた。すべての計算において Gaussian03 プログラムを用いた [3]。

倫理面への配慮

本研究は主に計算による構造および物性予測を対象とするため倫理的問題は生じない。

C 結果と考察

現在、いくつかの計算手法がフタロシアニンとその誘導体の励起エネルギーの予測に使われている。ZINDO/S、PM3、CIS、CAS、MRCI、SAPT、TDDFT などである。これらには X 線による構造、半経験的または第一原理計算で得られた構造が使われている。しかし残念ながら計算方法の違いを系統的に調べた研究や X 線のデータ、様々な計算方法の違いによる構造の励起

エネルギーへの影響に関する研究は行われていない。そのためまず、亜鉛pyridinoporphyrazine、亜鉛フタロシアニン、亜鉛poly(benzo)-poly(3,4-pyrido) porphyrazines の可能な同位体の計算を行った。これらのいくつか (2, 3-7) は癌の光線力学治療の有効な光吸収剤として提案されているものである。

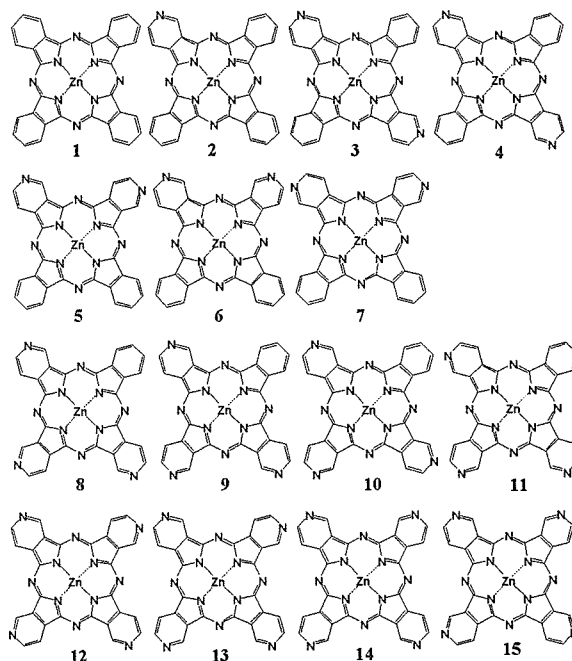


Fig.2. Structural isomers of pyridinoporphyrazines and their structural analogues.

亜鉛pyridinoporphyrazine、亜鉛フタロシアニン、亜鉛poly(benzo)-poly(3,4-pyrido) porphyrazines の孤立系の計算は TDDFT、ZINDO/S、PM3 を用いて行った。分子構造、基底、交換相関項、半経験的パラメーターの可視、紫外領域のスペクトルへの影響を調べた。一般に TDDFT は半経験的手法よりも吸収スペクトルは正確に求まる。さらにフタロシアニンの励起エネルギーに関しては PCM-TDDFT により調

べられ、溶媒効果は小さいことが明らかになっている。これは実験結果とも一致しており、孤立系のTDDFT計算は溶媒中のこれらの錯体の可視、紫外領域のスペクトル計算として十分良いものであると言える。

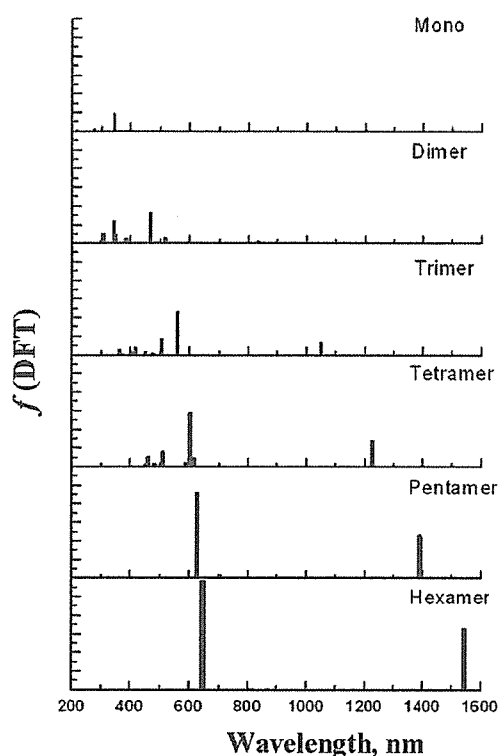


Fig.3. Calculated oscillator strength $f(\text{DFT})$ for porphyrin array depends on chain length.

これらの結果に基づき、長さの異なるポルフィリンオリゴマーの励起状態を計算した。Fig. 3にそれらの吸収スペクトルを示す。オリゴマーが長くなるに従い、吸収ピークは赤外領域にシフトし、ソーレー帯の強度は小さくなった。

これらのオリゴマーの溶解度を上げるために、いくつかのラディカルを加えたも

のが作られている。メソの位置に $-\text{SO}_3\text{H}$ や $-\text{COOH}$ をつけたものである (Fig. 1 参照)。計算結果は望ましい近赤外領域のピーク位置や強度にこれらの化学修飾はあまり影響を及ぼさないことを示していた。

D 結論

本研究により TDDFT はポルフィリンおよびフタロシアニン基錯体の吸収特性を正確に予測できることを明らかにした。ポルフィリンオリゴマーの溶解度を上げる試みも研究されているが、これらの化学修飾は吸収波長には影響がないことが明らかになった。このようにして、より効率の良い製造方法とともに量子力学に基づく分子、クラスターの構造の理論的研究は所望の物理的・化学的性質をもつ新しいナノ材料設計の重要な手法になる。沢山の候補となる材料の合成とテストの代わりに、この手法は選別を行うことができ、実験は少数の最も有望な材料のみに行えばよいことになる。

参考文献

- [1] Ali H and van Lier JE. Metal Complexes as Photo- and Radiosensitizers. *Chem Rev* 1999; 99: 2379-2450.
- [2] Tsuda A and Otsuka A. Fully Conjugated Porphyrin Tapes with Electronic Absorption Bands That Reach into Infrared. *Science* 2001; 293: 79-82.
- [3] Frisch JM, et al. Gaussian 03, Revision B. 04; Gaussian, Inc.: Pittsburg, PA, 2003.

[4] Nemykin VN, Belosludov RV, Mizuseki H, Kawazoe Y. Modeling of the Vertical Excitation Energies in the Structural Isomers of Pyridinoporphyrazines and Their Structural Analogues Using TDDFT, PCM-TDDFT, ZINDO/S, and PM3 Methods. *J. of Porphyrins and Phthalocyanines* 2006; 10: 792,.

がん転移に関わる細胞運動の *in vitro* 及び *in vivo* イメージングに関する研究

（分担）研究者 権田 幸祐 東北大学医工学研究機構 助手

研究要旨

細胞運動はがん転移に必須の生命現象である。ディッシュ上 (*in vitro*) の細胞運動では、細胞の進行方向へアクチン系細胞骨格をベースにした仮足が形成され、運動に重要な役割を果たしている。しかし、腫瘍内には血管や3次元的な細胞間相互作用が存在し、これらをディッシュ内で再現することは極めて困難である。よって腫瘍内の細胞運動を正確に理解するためには、生きた腫瘍 (*in vivo*) を直接観察することが必要となる。これまでに、マイクロメーター、秒スケールで腫瘍内細胞運動の解析が行われているが、この分解能では分子運動の詳細を理解することは困難である。本研究では、腫瘍内の細胞運動の詳細を明らかにするために、高輝度で長時間観察可能な量子ドットを用い、ナノメーター、ミリ秒スケールで生きた腫瘍の細胞運動を観察することを試みた。その結果、腫瘍細胞が血管方向へ向かって糸状仮足様構造を進展させている像を得ることや膜の伸縮運動をナノメータースケールで解析することに成功した。

A 研究目的

がん転移に関わる細胞運動をナノメーター、ミリ秒スケールで *in vivo* イメージングし、転移のメカニズムを明らかにする。

B 研究方法

低運動性ヒト乳がん培養細胞KPL-4 (HER2 (Human Epidermal growth Factor Receptor 2) 高発現株) に、乳がん細胞の運動性・転移能を活性化する遺伝子PAR1を導入し、細胞の運動性・浸潤能を高めた。また、仮足を強くイメージングするために、細胞には蛍光蛋白質融合アクチン遺伝子も導入した。次に細胞膜をラベルするプローブを作製するために、高輝度で退色時間が長い量子ドットに膜蛋白質HER2に対する抗体を結合させた。このプローブを用いて、(1) 形質転換した細胞をラベルし *in vitro* で観察を行うこと、(2) 形

質転換細胞を用いてヌードマウスに腫瘍を調製し、マウス尻静脈から注入したプローブでラベルされた腫瘍細胞の *in vivo* 観察を行うこと、(3) *in vitro* と *in vivo* 間のデータの比較を行うことを試みた。また、観察は粒子の動く方向性がある程度限定される糸状仮足（直径100-200nmの棘状構造）の膜先端に注目して行い、解析は下記のイメージングシステムを用いて行った。

【イメージングシステム】 IX71落射照明顕微鏡(オリンパス)に、532nm or 670nmレーザー、EM-CCD(アンドール)を組み合わせ、これに独自に開発したマウス観察用の低振動性ステージを取り付けてマウス用イメージング装置を開発した。イメージング画像は、分担研究者の渡邊によ

って開発された輝点解析用ソフトを用いて解析した。

倫理面への配慮

本研究は現在までのところ人体を対象とした実験を行っていないため倫理的問題は生じない。

C 研究結果

*in vitro*において、細胞運動時の糸状仮足先端の量子ドットの軌跡を1フレーム33msで観察した。得られた粒子の軌跡を平均2乗変位という粒子の拡散係数を求める方法で解析した(この解析法では粒子が方向性を持たない拡散性の動きをしている場合、1次関数の直線で近似することが出来る)。その結果、拡散係数は $43\text{nm}^2/\text{ms}$ として求めることが出来た。

次に腫瘍細胞の*in vivo*イメージングを試みた。血流が見られる血管近傍の腫瘍細胞の膜伸縮運動を1フレーム33msで観察することに成功した。その結果、腫瘍細胞の膜伸縮運動は血管に近い側面で活発に起こっていることが分かった。また、取得画像を積算した結果、腫瘍細胞の糸状仮足様の構造がイメージングされ、腫瘍細胞の運動の際もこのような構造が重要なことが示唆された。さらにこの糸状仮足様構造先端の量子ドットの解析を行った結果、拡散係数= $117\text{nm}^2/\text{ms}$ として算出することができた。準備を行っている。

D 考察と結論

本研究では、がん転移に重要な腫瘍細胞の膜伸縮運動と血流のイメージを同時に取得することに成功した。このイメー

ジングにナノメーター、ミリ秒スケールで成功したのは世界で初めてである。また、イメージングの結果、血管近くの腫瘍細胞は、血管方向へ向かって局所的に糸状仮足様構造を構築していることが分かり、その先端での膜構造の動きをナノメーターレベルで検出することができた。*in vitro*と*in vivo*間の糸状仮足先端の膜構造の拡散係数値の違いは、両環境下の違い(活性化物質濃度、活性化部位など)に起因するものと考えられる。今後は、本研究によって開発された「がん転移の*in vivo*イメージング技術」の精度をさらに発展させると共に、抗がん剤のがん転移への効果を1細胞レベルでリアルタイム観察する技術に応用したいと考えている。

F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G 研究発表

1. 学会発表

- 1) Gonda K, Watanabe TM, Higuchi H. Imaging of membrane protrusion of cellular migration in tumor using quantum dots. International Symposium on Bio-nanosystems, September, Matsushima, Japan, December, 2006
- 2) Watanabe, T.M., Sato, T., Gonda, K., and Higuchi, H. Three dimensional nanometry moving vesicle in a living cell. 5th East Asian Biophysics

Symposium & 44rth Annual Meeting of
the Biophysical Society of Japan,
Okinawa, Japan, November, 2006

- 3) Gonda, K., Watanabe, T.M., and Higuchi, H. Imaging of membrane protrusion of cellular migration in tumor using quantum dots. 5th East Asian Biophysics Symposium & 44rth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, November, 2006
- 4) 樋口秀男, 渡辺朋信, 権田幸祐、細胞およびマウス内の 1 分子ナノイメージング。第 15 回日本バイオイメージング学会、盛岡、2006 年 10 月 31 日～11 月 2 日
- 5) 権田幸祐, 渡辺朋信, 樋口秀男、マウス腫瘍内の細胞運動の解析。日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋、2006 年 12 月
- (6) 権田幸祐, 渡辺朋信, 樋口秀男、量子ドットを用いたマウス腫瘍内細胞運動のイメージング。2007 年生体運動合同班会議、金沢、2007 年 1 月

II. 知的財産権の出願登録状況

なし

音響光学効果を利用した超音波タグ蛍光イメージング法に関する研究

（分担）研究者 小林 正樹 東北工業大学 教授

研究要旨

量子ドットを用いたがんの転移が頻発するリンパ節の検出や量子ドット-抗体複合体を用いた腫瘍の検出のため、生体内蛍光を高精度にイメージングする、高感度蛍光イメージングシステムの開発を行った。本年度は内視鏡を利用したセンチネルリンパ節蛍光検出装置の試作を行うとともに、生体外から非侵襲的に生体深部の蛍光イメージングを可能とするための音響光学効果を利用した超音波タグ蛍光イメージング法を利用した新規イメージング装置開発のための研究を行った。

A. 研究目的

従来の蛍光検出法では、生体のような散乱媒質中の蛍光分布計測を行うことはできない。われわれは散乱媒質中の蛍光分布を高い解像度で計測するため、超音波と光の相互作用を利用して空間選択的に蛍光分布情報を得ることの可能な、超音波タグ蛍光断層イメージング法について検討を行なった。

B. 研究方法

生体組織内に超音波音場が形成されると、屈折や散乱係数などの光学特性の空間分布が誘起され、このとき、音場内の光は音圧変化に依存して強度変調される。媒質内で焦点を結ぶ集束超音波を利用すると、音場焦点において空間選択的に強度変調を与えることができる。媒質中に蛍光物質が局在するとき、外部において観

測される変調蛍光信号は超音波焦点と蛍光体の位置が一致したときに最大となる。図1に超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック図を示す。CWレーザー光を、蒸留水を満たしたアクリル水槽に入射し、レーザー光軸と直交するよう配置した共振周波数1MHzの水中用トランスデューサにより集束超音波を照射した。集束超音波焦点におけるビーム幅は3mm焦点距離41mmである。水槽のトランスデューサ対向面には、定在波の発生を抑えるための吸収板を配置した。アクリル水槽は3軸自動ステージ（X軸：入射レーザー光軸方向，Y軸：超音波伝搬方向，Z軸：高さ方向）上に設置した。測定用生体試料はアクリル容器内に入れ、その容器は水槽に触れない様にして外部から固定した。水槽のみを3軸移動することにより、超音波焦点が測定試料内を走査し、各点にお

いて変調蛍光信号を検出した。蛍光検出は、バンドパス干渉フィルタを装着した光電子増倍管により行い、変調信号成分をスペクトラムアナライザにより検波した。

測定では生体模擬試料として体積濃度40ml/LのIntralipid-10%水溶液をアガロースによりゲル化し、40×40×70mmに成型したものをを用いた。その中央部には蛍光微粒子 (Fluoresbrite Carboxylate Micro-spheres NYO 蛍光波長590nm) を混合したアガロースを、直径3mm高さ5mmの円柱形に成形して包埋した。光源にはDPSSレーザ (波長532nm) をを用いた。また生体試料として、ロースハム (明治ケンコー ロースハム) を散乱媒質とした検討を行った。前述の生体模擬試料と同様にロースハムを40mm×40mm×70mmに整形し、その中央部に蛍光微粒子 (FluoSpheres carboxylate-modified microspheres 0.04 μ m, infrared fluorescent 715/755) を、直径3mm、高さ5mmのシリコンチューブに入れて試料内に挿入した。このとき光源には、波長726nm、出力50mWのTi:Sapphireレーザを用いた。X、Y両軸の走査は、試料中心部20mmを0.25mm～1mmの分解能で行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

図2にアガロース生体模擬試料を用いて画像化した結果を示す。また測定後に縦方向に切断した生体模擬試料の断面写真を図3に示す。試料中央に蛍光体が包埋

されている様子がわかる。図2において、中心付近に蛍光強度ピークが明瞭に検出され、そのサイズは実際の蛍光体サイズにほぼ一致した。

図4は市販のロースハムによる2次元画像計測結果である。このときの走査分解能は0.5mmである。走査範囲の中心付近に蛍光変調信号のピークを確認することができる。また図5はピークを含む光軸方向の蛍光強度プロファイルであるが、信号強度ピーク的位置は挿入された蛍光体の位置にほぼ一致した。半値幅は4～5mmであった。

その他の生体試料として牛脂ブロック、豚ロース肉を用いた場合についても、同様に蛍光変調信号のピークを確認することができた。

D. 考察

集束超音波の焦点サイズとほぼ同程度の分解能で、深さ20mmの生体組織中に局在した蛍光物質分布を画像計測することができた。また、散乱媒質内に複数箇所蛍光物質を包埋した場合においても、超音波焦点サイズ程度の解像が可能であることがわかった。現在の計測系でのSN比から推定すると、800nm程度の近赤外蛍光を用いることにより、深さ30mm程度までの生体内部の計測が可能であると見積もられる。

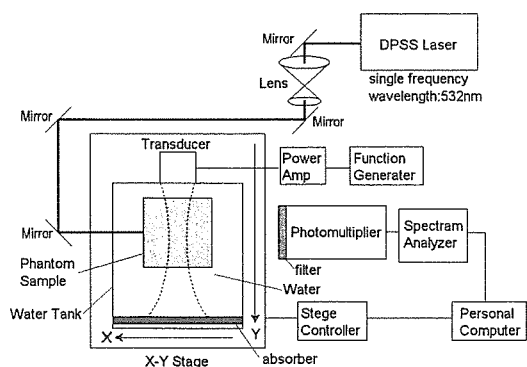


図1 超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック図

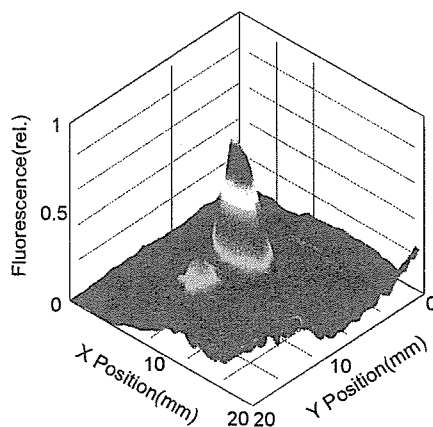


図4 ロースハム内に蛍光体を包埋した生体試料による蛍光断層画像

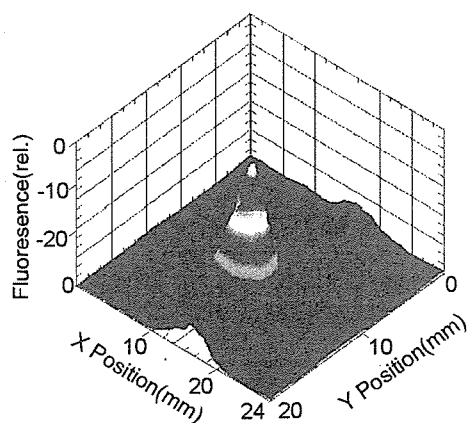


図2 Intralipid・アガロースゲル内に蛍光物質を包埋した生体模擬試料内部の蛍光分布画像

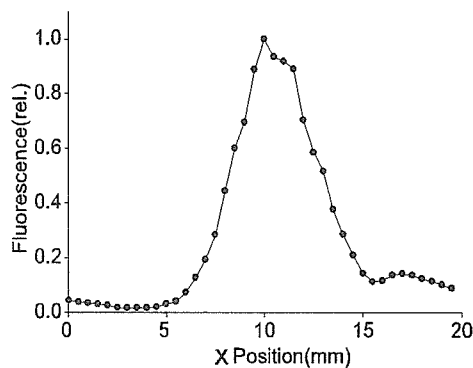


図5 ロースハム内に蛍光体を包埋した生体試料による光軸方向のプロファイル

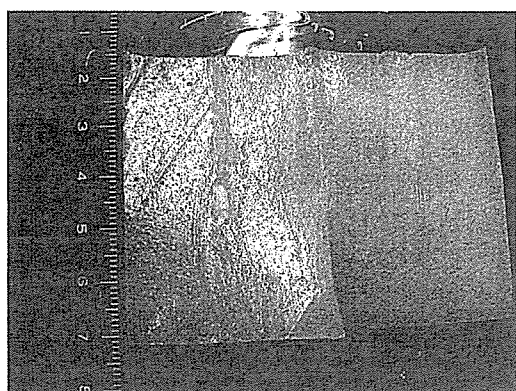


図3 生体模擬試料の切断面写真

E. 結論

本研究では、光散乱媒質内部の蛍光分布の可視化として、超音波タグ蛍光断層画像計測システムの研究開発を行い、生体試料を用いた評価実験を行った。これにより生体内部においておよそ30mm程度の深部蛍光分布の計測が、センチネルリンパ節検索に応用する上での実用的解像度で可能であるとの結論を得た。現在のところ超音波焦点はプローブ形状で決まる固定型であるため機械的走査による画像

化を行っており、リアルタイムでの画像計測が困難である。これを超音波アレイ素子により電子走査化し、より高速な計測を実現する必要がある。今後、実用化へ向けた検討として、アレイ素子を用いた、計測プローブの開発を行うとともに、深さ30mmを目標として大型動物を用いた、実際の生体による検討を行っていくつもりである。

F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Enomoto M, Takeda M. Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. *Appl Phys Lett* 2006; 89(18): 181102.

2) Kobayashi M, Kasamatsu T, Shibuya Y, Enomoto M. Optical visualization of ultrasound pressure fields in turbid media based on a coherent detection imaging technique. *Jpn J Appl Phys* 2006; 45(A3): 1836-1840.

3) van Wijk R, Kobayashi M, van Wijk E, Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a movable photomultiplier and CCD imaging. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 2006; 83: 69-76.

2. 学会発表

1) Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Enomoto M, Takeda M. Fluorescence Tomographic imaging using the Ultrasound Tagging Technique. The 9th International Conference on Optics within Life Sciences, Taipei, Taiwan, November 2006.

2) 水本喬, 武田元博, 榎本幹, 小林正樹, 音響光学効果を利用した生体計測のための超音波タグ蛍光イメージング法. 応用物理学会東北支部第 61 回学術講演会講演予稿集, 講演番号 8pA12, p. 112、2006 年 3 月、仙台

3) 水本喬, 武田元博, 榎本幹, 小林正樹, 超音波-光相互作用を利用した生体蛍光断層画像計測法の基礎検討. 第 40 回生体医工学会東北支部大会, 抄録集 p. 2 2006 年

4) 菊地大輔, 岡村均, 小林正樹, 超高感度バイオフィトンイメージングによるヒト体表バイオフィトンのサーカディアンリズム分析. 第 40 回生体医工学会東北支部大会, 抄録集 p.8、2006 年

5) 水本喬, 武田元博, 榎本幹, 小林正樹, 超音波-光相互作用を利用した生体蛍光断層画像計測法の基礎検討. 第 27 回日本レーザー医学会総会, 論文番号 O6-1, 日本レーザー医学会誌 Vol.27 No.3, p. 234、2006 年

- 6) 菊地大輔, 岡村均, 小林正樹, 超高感度 CCD によるヒト体表バイオフォトン概日リズムの画像計測. 第 27 回日本レーザー医学会総会, 論文番号 O5-3, 日本レーザー医学会誌 Vol.27 No.3, p. 233、2006 年
- 7) 水本喬, 武田元博, 榎本幹, 小林正樹, 超音波-光相互作用を利用した生体蛍光断層画像計測法の基礎検討. 平成 18 年度電気関係学会東北支部連合大会, 論文番号 1C11, 講演論文集 p.85、2006 年
- 8) 菊地大輔, 岡村均, 小林正樹, ヒト体表バイオフォトン画像計測によるバイオフォトン発光と生体リズムの相関の検討. 平成 18 年度電気関係学会東北支部連合大会, 論文番号 1C12, 講演論文集 p.86、2006 年
- 9) 水本喬, 渋谷幸弘, 榎本幹, 武田元博, 小林正樹, 集束超音波を用いた超音波-光相互作用に基づく散乱媒質内蛍光イメージング法の基礎検討. 第 45 回日本生体医工学会大会, 講演番号 P3(16AM)-13-4, 生体医工学 Vol.44, suppl.1, p.514、2006 年
- 10) 今野淳, 鈴木聡, 武田元博, 水野麻弥, 小川雄一, 川瀬晃道, 小林正樹, 培養がん細胞 AH109 からのバイオフォトン検出による細胞代謝活性計測の検討. 第 45 回日本生体医工学会大会, 講演番号 P2(15PM)-18-5, 生体医工学 Vol.44, suppl.1, p.434、2006 年
- 11) 伊藤勇樹, 今野淳, 鈴木聡, 武田元博, 小林正樹, 培養がん細胞由来バイオフォトンの検出と代謝活性計測への応用. 平成 18 年東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-4-59, 講演資料 p.117、2006 年
- 12) 菊地大輔, 青山史裕, 泉谷一也, 岡村均, 小林正樹, 超高感度 CCD を用いたヒト体表バイオフォトンイメージングによる生理情報計測 I - 生体リズムとバイオフォトン発光 -. 平成 18 年東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-4-63, 講演資料 p.125、2006 年
- 13) 青山史裕, 菊地大輔, 泉谷一也, 小林正樹, 超高感度 CCD を用いたヒト体表バイオフォトンイメージングによる生理情報計測 II - バイオフォトン発光の体表温度依存性 -. 平成 18 年東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-4-64, 講演資料 p.127、2006 年
- 14) 水本喬, 渋谷幸弘, 児玉優, 榎本幹, 小林正樹, 超音波-光相互作用に基づく生体内蛍光イメージング法の基礎検討. 平成 18 年東北地区若手研究者研究発表会講演番号 YS-4-65, 講演資料 p.129、2006 年
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許 (公開)
「蛍光断層画像計測装置」小林正樹, (株)システム計測, 特開2006-055396
 2. 実用新案登録
該当なし

シリカカプセル化粒子の作製法の開発とその造影能評価に関する研究

（分担）研究者 小林 芳男 茨城大学工学部 教授

（分担）研究者 粕谷 厚生 東北大学学際科学国際高等研究センター 教授

研究要旨

これまでに開発した AgI ナノ粒子のシリカカプセル化法を改良し、1段階の反応で高ヨード濃度のシリカカプセル化 AgI ナノ粒子を作製する方法を開発した。また、シリカ粒子と Gd 塩共存下、尿素の加水分解を行うことにより、シリカ-Gd コア-シェル粒子の作製に成功した。さらに Stöber 法により、その外側にシリカを形成させることができた。すなわち、シリカ-Gd-シリカ多層複合粒子の作製に成功した。この多層複合粒子は良好な MR 造影能を有することが確認された。医療分野でのセンシングに利用が期待される。

A 研究目的

X 線あるいは MR 造影剤はアレルギー等の副作用が問題となっている。また、これらの造影剤は溶液状であるので、分析部位に長時間留まることができないため、安定した造影を行うことが困難である。その解決策として造影能を有する材料のカプセル化が考えられる。これにより、造影剤と生体が直接接触れることを防ぎ、さらには体液中での造影剤の流速を制御できると予想されるので、良好な造影能を発現することが期待される。本研究は、X 線造影能を有するヨード化合物として合成が比較的容易な AgI を、MR 造影能を有する物質として知られる Gd を取り上げ、これらの材料のシリカカプセル化法を開発し、その造影能に関する評価を行った。

B 研究方法

1. 各種複合粒子の作製

1-1. シリカカプセル化 AgI ナノ粒子コロイドの高濃度化：これまで開発してきたシリカカプセル化 AgI ナノ粒子コロイドの作製法では、ヨード濃度が 10^{-4} mol/l という低濃度であった。本研究では、AgI ナノ粒子の分散性を考慮して、高ヨード濃度シリカカプセル化 AgI ナノ粒子コロイドの作製を行った。

1-2. シリカ-Gd-シリカ多層複合粒子の作製：球状単分散シリカ粒子をコアとし、希土類化合物を均一沈殿法でコーティングし、さらにその外側を Stöber 法によりシリカでカプセル化して多層カプセル化粒子とした。

2. キャラクターゼーション

2-1. 構造解析：粒子の形状を電子顕微鏡