

(TEM, STEM)により、粒子のゼータ電位をレーザーゼータ電位計により、それぞれ調べた。

2-2. X線およびMR造影能：武田らと共同で、X線やMRによる撮影や動物実験を行い、得られた微粒子コロイドの各種造影能を評価した。

#### 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。また、動物実験は全て麻酔下で行い、動物愛護に十分配慮してある。

#### C 研究結果

1. シリカカプセル化AgIナノ粒子：作製時における各種試薬の濃度条件を適切に定めることにより、良好なシリカカプセル化AgIナノ粒子が作製できた。図1に得られたカプセル化粒子のTEM像の一例を示す。平均粒子径約30nm程度のカプセル化粒子が観察された。この成果に関しては、第8回化学工学会学生発表会一関大会

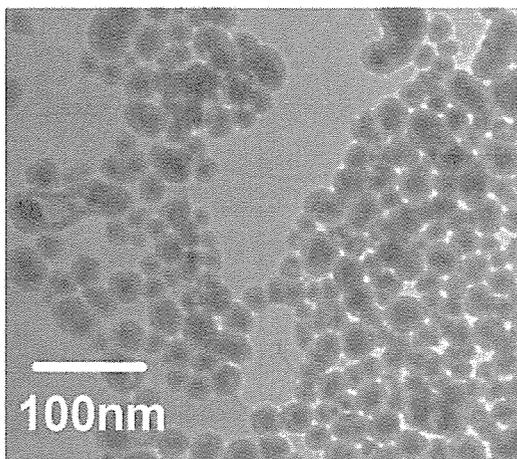


図1. シリカカプセル化AgIナノ粒子のTEM像。

およびThe 4th International Conference on Advanced Materials (ICAMP-4)で報告した。また、このカプセル化粒子は良好なX造影能を発現することを確認した。この内容に関しては、The 25th Congress of the International Association for Breast Cancer Researchで報告し、その概要はBreast Disease誌にまとめられている。

2. シリカ-Gd-シリカ多層複合粒子：図2にGdを用いたカプセル化粒子のSTEM像を示す。シリカ-Gd粒子では、単独のGd化合物は観察されず、Gd化合物シェルが形成した。シリカ-Gd-シリカ粒子に関しては、Gdシェルの上にシリカシェルが形成しているのが確認できた。図3に各種試料のMRI像を示す。いずれの粒子分散液も

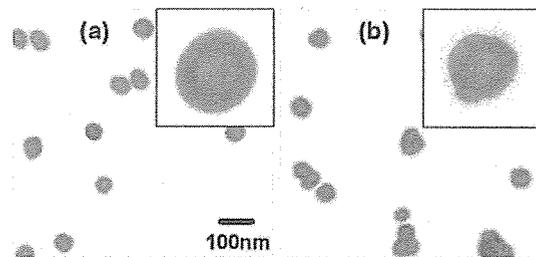


図2. 各種粒子のSTEM像。

(a)シリカ-Gd粒子、(b)シリカ-Gd-シリカ粒子。

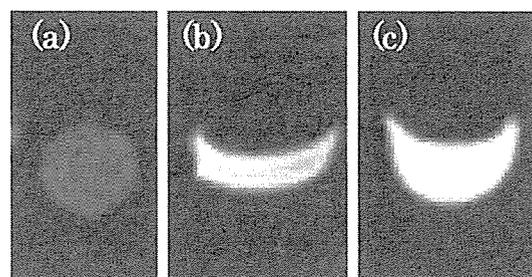


図3. 各種試料のMRI像 (T1強調)

(a)H<sub>2</sub>O、(b)シリカ-Gd粒子、(c)シリカ-Gd-シリカ粒子。

造影可能であり、明瞭なMRI像が得られた。このため、MRI造影剤としての利用が期待される。これに関しては、The 25th Congress of the International Association for Breast Cancer Researchで報告し、その概要はBreast Disease誌にまとめられている。また、特許出願の準備を行っている。

#### D 考察

得られたシリカカプセル化AgIナノ粒子およびシリカ-Gd-シリカ多層複合粒子は良好なX線およびMR造影能をそれぞれ有することが確認できた。各種センシングへの応用が期待できる。実用的には高濃度でしかも分散性が優れるコロイド溶液を用いる必要があるため、今後はこれらの点を解決する技術の開発が必要となる。そのほか、金ナノ粒子のコーティングを行い、現在造影剤としての有用性、安全性を確認している。

#### E 結論

液相中での化学反応を利用して、各種シリカカプセル化ナノ粒子の作製に成功した。得られた複合粒子はX線やMR造影能を発現することを確認しており、新たな医療診断材料として利用可能であるといえる。今後、さらに新しい応用や新しい診断技術の開発が期待される。

#### 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) 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.

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.

##### 2. 学会発表

1) 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/SiO<sub>2</sub>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、一関市、平成18年3月

2) Kobayashi Y, Misawa K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M. Control of Shell Thickness in Silica-Coating of AgI Nanoparticles. The 4th International Conference on Advanced Materials (ICAMP-4), Hamilton, New Zealand, 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. The 25th Congress of the International Association for Breast Cancer Research, Montreal, Canada, 2006 .

4) 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. The 25th Congress of the International Association for Breast Cancer Research, Montreal, Canada, 2006

5) Park YS, Liz-Marzán LM, Kasuya A, Kobayashi Y, Nagao D, Konno M, Mamykin S, Dmytruk A, Takeda M and Ohuchi N, X-ray Absorption of the Gold Nanoparticles with Thin Silica Shell. J Nanosci Nanotechnol, 6 (11): 3503-06, 2006

II. 知的財産権の出願登録状況  
準備中

超臨界 in-situ 表面修飾法を用いたハイブリッドナノ粒子合成に関する研究

（分担）研究者 名嘉 節・東北大学多元物質科学研究所・助教授

研究要旨

超臨界 in-situ 表面修飾法により、水中および溶媒中に良分散する各種蛍光・磁気ハイブリッドナノ粒子を合成することが可能である。今回、高感度計測を可能とする新規蛍光マーカーとして、BaSnO<sub>3</sub> ナノ粒子、X線・MRI マーカーとして、Gd 水酸化物の表面修飾ナノ粒子を合成することに成功した。

A 研究目的

高感度計測を可能とする新規蛍光・X線・MRIマーカーとして、超臨界水熱合成法を用いて、溶媒中に良分散する無機-有機ハイブリッドナノ粒子を開発する。

B 研究方法

超臨界in-situ表面修飾法により、水中および溶媒中に良分散する各種蛍光・磁気ハイブリッドナノ粒子を合成する。癌組織への選択性を付与するために、ナノ粒子表面への有機分子修飾によりサイズ・形態・生体親和性を制御する。

倫理面への配慮

本研究は物質合成であるため倫理的問題は生じない。

C 研究結果

常磁性のMRIマーカーとして、Gd水酸化物の表面修飾ナノ粒子の合成およびサイズ制御に成功した。また、蛍光マーカーとして、BaSnO<sub>3</sub>のナノ粒子合成し、遠赤外領域に強い蛍光強度を有することを確認した。これらのナノ粒子は幅広いpH領域で重元素の溶出などが極めて少なく、有機色素とは異なり退光現象も観測されなかった。

D 考察

有機 - 無機ナノ粒子を生体中で蛍光・X線・MRIマーカーとして用いる際、必要な特性として、個々の無機物質の特性以外に、水中および各種溶媒への良分散性、低生体侵襲性、（主に時間的な）安定性などの条件を満たす必要がある。今回は、水酸化物や酸化物物質の有機分子表面修飾ナノ粒子化に成功したことにより、これらの条件を満たす合成方法を確立した。

## E 結論

高感度計測を可能とする新規蛍光・X線・MRIマーカーとして、Gd水酸化物およびBaSnO<sub>3</sub>を開発した。

## G 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Zhang J, Ohara S, Umetsu M, Naka T, Hatakeyama Y, Adschiri T. Novel Approach to Colloidal Ceria Nanocrystals: Tailor-made Crystal Shape in Supercritical Water. Adv. Mater. 2007 (in press).
- 2) Mousavand T, et al. Supercritical Hydrothermal Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticles. J Mater Sci 2006; 41: 1445-1448.

## 2. 学会発表

- 1) SASAKI T, OHARA S, UMETSU M, NAKA T and ADSCHIRI T, Supercritical Hydrothermal Synthesis of Hybrid Gd(OH)<sub>3</sub> Nanoparticles : Application to Neutron Capture Therapy. The 1<sup>st</sup> international symposium on supercritical fluid synthesis and materials, Beijing, Mar. 2007.

## II. 知的財産権の出願登録状況 なし

Q-dot を用いた体内時計タンパク検出に関する研究

（分担）研究者 石田 直理雄 産業技術総合研究所 生物機能工学部門生物時計研究  
グループ長

研究要旨

ショウジョウバエをモデルとして、生体内で主に転写因子として働く体内時計タンパク LacZ について、脳や唾腺における発現を Q-ドット-2 次抗体で検出を試みた。その結果、従来法と異なり、LacZ の発現を検出できなかった。

A 研究目的

ナノテクノロジー、特に Q-ドットを用いた生体分子を生体内で高感度にとらえる方法は現在、様々な分野で試みられている。我々は、生体内で主に転写因子として働く体内時計タンパクの Q-ドットによる可視化を試みている。

B 研究方法

哺乳類体内時計分子機構の良いモデルとなっているショウジョウバエを用いた。抗PERIOD抗体やRh5プロモーターでドライブしたLacZの発現をショウジョウバエ脳や唾腺でQ-ドットを2次抗体(In vitro-gen社)として用いて試みる。

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。また、動物実験は全て麻酔下で行い、動物愛護に十分配慮してあ

る。

C 結果と考察

ショウジョウバエ脳、唾腺のいずれにおいても、ローダミン 2 次抗体で取れるシグナルが Q-ドットを使うと同定できなかった。そこで、同じく時計転写因子の Myc-E4BP4 を用いて、培養細胞に強制発現させてウエスタン・ブロッティング法で Q-ドットによる検出を試みた結果、予定のバンドが同定できた。これらの結果から現在の所 Q-ドット法が旧来の 2 次抗体法より感度的に劣っていると考えられた。

D 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。

E 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oishi K, Ohkura N, Ishida N. Adrenal gland-dependent augmentation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Thrombosis and Haemastasis* 2006; 4: 1566-1574.
  
- 2) Oishi K, Ohkura N, Wakabayashi M, Shirai H, Sato K, Matsuda J, Atsumi G, Ishida N. CLOCK is involved in obesity-induced disordered fibrinolysis in *ob/ob* mice by regulating *PAI-1* gene expression. *Journal of Thrombosis and Haemastasis* 2006; 4: 1774-1780.
  
- 3) Ohno T, Onishi Y, Ishida N. A novel E4BP4 element drives circadian expression of *mPeriod2*. *Nucleic Acids Research* 2007; 35 (2): 648-655.
  
- 4) Ishida N. Circadian clock, cancer and lipid metabolism. *Neuroscience Research* 2007; 57 (4): 483-490.

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 1

雑誌論文  
(2006～  
2007年)

発表者氏名	連名著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	号	開始頁	終了頁	出版年
Tada H	Higuchi H, Watanabe TM, Ohuchi N	In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice.	Cancer Res.	67		1138	1144	2007
Kobayashi M	Mizumoto T, Shibuya Y, Enomoto M, Takeda M	Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging	Appl. Phys. Lett.	89	18	181102-1	181102-3	2006
Li-Shishido S	Watanabe TM, Tada H, Ohuchi N.	Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining	Biochem Biophys Res Commun.	351		7	13	2006
Zhang J	Ohara S, Umetsu M, Naka T, Hatakeyama Y, Adschiri T	Colloidal Ceria Nanocrystals: A Tailor-made Crystal Morphology in Supercritical Hydrothermal Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid	Adv. Mater.	19	2	203	206	2007
Mousavand T	Takami S, Umetsu M, Ohara S, Adschiri T	Optical visualization of ultrasound pressure fields in turbid media based on a coherent detection imaging technique	J. Mater. Sci.	41	5	1445	1448	2006
Kobayashi M	Kasamatsu T, Shibuya Y, Enomoto M	Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a movable photomultiplier and CCD imaging	Jpn. J. Appl. Phys.	45	A3	1836	1840	2006
van Wijk R	Kobayashi M, van Wijk E		J. Photochem. Photobiol. B: Biol.	83		69	76	2006

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	25		55	56	2006
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	25		47	47	2006
Tada H	Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N	Imaging of tumor-targeting quantum dot in breast cancer of living mice	Breast Disease	25		43	43	2006
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	25		47	47	2006
Toba S	Watanabe TM, Yamaguchi-Okimoto L, Toyoshima YY, Higuchi H	Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein.	Proc Natl Acad Sci USA	103		5741	5745	2006
Park YS	Liz-Marzán LM, Kasuya A, Kobayashi Y, Nagao D, Konno M, Mamykin S, Dmytruk A, Takeda M and Ohuchi N	X-ray Absorption of the Gold Nanoparticles with Thin Silica Shell.	J Nanosci Nanotechnol	6	11	3503	3506	2006
Sakurai Y	Takeda M, Kobayashi Y, Ohuchi N	Generation of nanosized silver-iodide beads for medical application	Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp			505	508	2006

Cong L	Kobayashi Y, Takeda M, Ohuchi N	Development of silica coated silver iodide nano-particles in different sizes for novel x-ray contrast media.	Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp	311	315	2006
Kawai M	Higuchi H, Watanabe TM, Tada H, Ohuchi N	In vivo visualization of metastasis of human breast cancer cells labeled with Quantum dots in mice	Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp	369	376	2006
Li S	Higuchi H, Ohuchi N.	Effects of Trastuzumab and paclitaxel in HER2-overexpressing breast cancer	Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp	395	400	2006

Nakajima M	Takeda M, Kobayashi M, Ohuchi N	Nano-sized fluorescent particles as new tracers for sentinel node detection: an experimental model for decision of appropriate size and wavelength	Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp	465	472	2006
Tada H	Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N	In vivo breast cancer cell imaging using quantum dot conjugated with anti-her2 antibody	Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp	515	520	2006
Ohuchi N	Nakajima M, Tada H, Ishida T, Takeda M, Higuchi H	Nano-sensing capsules for medical application: nano-particles for sentinel navigation and quantum dots conjugation with anti-her2 antibody for molecular imaging of cancer	Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp	245	259	2006
Oishi K	Ohkura N, Ishida N	Adrenal gland-dependent augmentation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in streptozotocin-induced diabetic mice	Journal of Thrombosis and Haemastasis	1566	1574	2006

Oishi K	Ohkura N, Wakabayashi M, Shirai H, Sato K, Matsuda J, Atsumi G, N. Ishida	CLOCK is involved in obesity-induced disordered fibrinolysis in ob/ob mice by regulating PAI-1 gene expression	Journal of Thrombosis and Haemastasis	4	1774	1780	2006
Ohno T	Onishi Y, Ishida N	A novel E4BP4 element drives circadian expression of mPeriod2	Nucleic Acids Research	35	648	655	2007
Ishida N		Circadian clock, cancer and lipid metabolism	Neuroscience Research	57	483	490	2007
Mamykin S	Kasuya A, Dmytruk A, Ohuchi N	Photocurrent of nanoassembled Si film in contact with electrolyte	Journal of Alloys and Compounds	434	718	720	2007
大内憲明	武田元博、石田孝宣	「早期のがん治療法の選択放射線治療」	手術と放射線、山田章吾編		46	51	2006
中島護雄	武田元博、大内憲明	蛍光ナノ粒子による癌センサネルリンパ節検出とナノ医療の展望	日本機械学会誌	109	90	92	2006
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線センサネルリンパ節生検への応用	乳癌基礎研究	16	43	47	2006
大内憲明		<概論> ナノテクノロジーのがん医療への期待	バイオテクノロジージャーナル	7	22	24	2007
樋口秀男	渡邊朋信、李松花、多田寛、大内憲明	蛍光性量子ドットによるがん細胞の単一分子ナノイメージング	バイオテクノロジージャーナル	7	30	35	2007
武田元博	小林芳男、小林正樹、桜井遊、中島護雄、大内憲明	ナノサイズセンシングクラスターの新規開発と外科治療への応用	バイオテクノロジージャーナル	7	36	40	2007
多田寛	樋口秀男、渡邊朋信、大内憲明	抗HER2抗体標識量子ドットを用いたマウス腫瘍内での単粒子イメージング	可視化情報	26	181	182	2006
武田元博		医工連携のための技術者再教育プロジェクト	日本機械学会誌	109	20	21	2006

## 別紙2

学会発表 (2006～2007)

### 国内

平成18年東北地区若手研究者研究発表会、2006/2/28、仙台  
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

菊地大輔、青山史裕、泉谷一也、岡村均、小林正樹  
超高度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ー生体リズムとバイオフォトン発光ー

青山史裕、菊地大輔、泉谷一也、小林正樹  
超高度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ーバイオフォトン発光の体表温度依存性ー

水本高、渋谷幸弘、児玉優、榎本幹、小林正樹  
超音波ー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

第45回日本生体医学会大会、2006/5/15-17、福岡  
水本高、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ー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

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

平成18年度電気関係学会東北支部連合大会、2006/8/31-9/1、秋田  
水本高、武田元博、榎本幹、小林正樹  
超音波ー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

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

第27回日本レーザー医学会総会、2006/11/2-3、東京  
水本高、武田元博、榎本幹、小林正樹  
超音波ー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

菊地大輔、岡村均、小林正樹  
超高度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40回日本生体医学会東北支部大会、2006/11/25、仙台  
水本高、武田元博、榎本幹、小林正樹  
超音波ー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

菊地大輔、岡村均、小林正樹  
超高度バイオフォトンイメージングによるヒト体表バイオフォトンのサーカディアンリズム分析

- 第61回応用物理学会東北支部学術講演会、2006/12/7-8、仙台  
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8回化学工学学会学生発表会、2006/3/11、一関  
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/SiO<sub>2</sub>コア-シェル型複合粒子の合成
- 第106回日本外科学会定期学術集会、2006/3/29-31、東京  
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
- 中島護雄、武田元博、大内憲明  
蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検法の検討
- 武田元博、大内憲明  
ガドリニウムナノ粒子を用いた新規MRI造影剤の基礎的検討
- 第14回日本乳癌学会総会、2006/7/7-8、金沢  
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
- 多田寛、樋口秀男、渡邊朋信、大内憲明  
Quantum dotを用いたHER2発現乳癌担癌マウス腫瘍内での蛍光単粒子イメージング
- 2007年生体運動合同班会議、2007/1/7-9、金沢  
権田幸祐、渡邊朋信、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
- 第56回日本癌学会総会、2006/9/29-31、横浜  
樋口秀男、渡邊朋信、多田寛、大内憲明  
機能性ナノ粒子を用いたがん細胞の単一粒子ナノイメージング
- 第61回日本体力医学会、2006/9/24-26、神戸  
樋口秀男、渡邊朋信、多田寛、大内憲明  
光学顕微鏡技術を用いた、タンパク質・細胞・マウス内単一分子のイメージング
- ナノ学会第4回大会、2006/5/19-21、京都  
河合賢朗、樋口秀男、渡邊朋信、多田寛、大内憲明  
抗EGFR抗体標識量子ドットを用いたヒト乳癌細胞のマウス in vivoイメージング
- 第34回可視化情報シンポジウム、2006/7/24-26、東京  
多田寛、樋口秀男、渡邊朋信、大内憲明  
抗HER2抗体標識量子ドットを用いたマウス腫瘍内での単粒子イメージング

第15 回日本バイオイメージング学会、2006/10/31/-11/2、盛岡  
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

日本分子生物学会2006フォーラム、2006/12/6-8、名古屋  
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

第65回日本癌学会学術総会、2006/9/28-30、横浜  
樋口秀男、渡辺朋信、多田寛、大内憲明  
機能性ナノ粒子を用いたがん細胞の単一粒子ナノイメージング

武田元博、中島護雄、小林芳男、小林正樹、桜井遊、亀井尚、豊莉蔓、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サネルリンパ節イメージング

## 国際（海外）

SASAKI T, OHARA S, UMETSU M, NAKA T, ADSCHIRI T Supercritical Hydrothermal Synthesis of Hybrid Gd(OH)3 Nanoparticles : Application to Neutron Capture Therapy  
The 1st international symposium on supercritical fluid synthesis and materials, Beijing, China, Mar.2007

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 26-29, 2006

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 International association for breast cancer research, montreal, Canada, Sep.15-18, 2006

Kobayashi Y, Misawa M, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M, Control of Shell Thickness in Silica-Coating of AgI Nanoparticles  
The 4th International Conference on Advanced Materials (ICAMP-4), Hamilton, New Zealand, Dec. 10-13, 2006

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 International association for breast cancer research, montreal, Canada, Sep.15-18, 2006

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  
THEIR IN VIVO DISTRIBUTION  
The 8th International Symposium of Medical Engineering Based on Bio-nanotechnology, Singapore, Dec.4-5, 2006

Gonda K, Watanabe T, and Higuchi H. Imaging of membrane protrusion of cellular migration in tumor using quantum dots  
International Symposium on Bio-nanosystems, Matsushima, Japan, Sep.1-3, 2006

Watanabe T, Sato T, Gonda K, and Higuchi H. Three dimensional nanometry moving vesicle in a living cell

5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, Nov.12-16, 2006

**Gonda K, Watanabe T, and Higuchi H.** Imaging of membrane protrusion of cellular migration in tumor using quantum dots  
5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan Nov.12-16, 2006

**Higuchi H, Watanabe T.** Single molecule imaging of motor proteins in living cells  
The 7th international conference on systems Biology. Yokohama.Japan.Oct.9-13, 2006

**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*.  
The 25th Congress of the IABCR, Montreal, Sep. 15-48, 2006

**Park YS, Dmytruk A, Dmitruk I, Noda Y, Kasuya A, Ohuchi N.** Aqueous-Phase Synthesis of Ultra-Stable Small CdSe Nanoparticles.  
International Conference on Nano Science and Nano Technology (GI-NST 2006), Gwangju, Korea, Dec. 7-8,2006

**Kawai M, Higuchi H, Ohuchi N.** Imaging of EGFR for biological study.  
The 8th International Symposium of Future Medical Engineering based on Biomanotechnology, Singapore, Dec. 4-5, 2006.

**Tada H, Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N.** In vivo cancer targeting and imaging with quantum dots conjugated with anti-Her2 antibody.  
The 8th International Symposium of Future Medical Engineering based on Biomanotechnology, Singapore, Dec. 4-5, 2006

**Kawai M, Higuchi H, Ohuchi N.** Trastuzumab regulates receptor recycling on cancer cell.  
The 9th International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.

**Cong L, Takeda M, Ohuchi N.** Silica coated nano-particles for biomedical contrast imaging.  
The 9th International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.

**Li-Shishido S, Watanabe T, Tada H, Kawai M, Higuchi H, Ohuchi N.** Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining.  
The 9th International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.

**Tada H, Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N.** In vivo imaging using quantum dots in mice.  
The 9th International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.

**Sakurai Y, Takeda M, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei t, Amari M, Cong L, Ohuchi N.** Nano size silver iodide beads as novel contrast media for sentinel lymph node navigation surgery.  
The 9th International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.

別紙3

特許財産権の出願登録状況 (2006～2007年)

内容	発明者	権利者	知的財産権の種類	番号	出願年月日	取得年月日
蛍光断層画像計測装置	小林正樹, (株)システム計測		特許	2006-55396		

新聞記事

誌名	年月日	タイトル
河北新報	2007.2.8	抗がん剤動き把握分子レベル画像化

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# *In vivo* Real-time Tracking of Single Quantum Dots Conjugated with Monoclonal Anti-HER2 Antibody in Tumors of Mice

Hiroshi Tada,<sup>1</sup> Hideo Higuchi,<sup>2</sup> Tomonobu M. Wanatabe,<sup>2</sup> and Noriaki Ohuchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Surgical Oncology, Graduate School of Medicine and <sup>2</sup>Biomedical Engineering Research, Organization, Tohoku University, Sendai, Japan

## Abstract

Studies with tracking of single nanoparticles are providing new insights into the interactions and processes involved in the transport of drug carriers in living mice. Here, we report the tracking of a single particle quantum dot (Qdot) conjugated with tumor-targeting antibody in tumors of living mice using a dorsal skinfold chamber and a high-speed confocal microscope with a high-sensitivity camera. Qdot labeled with the monoclonal anti-HER2 antibody was injected into mice with HER2-overexpressing breast cancer to analyze the molecular processes of its mechanistic delivery to the tumor. Movement of single complexes of the Qdot-antibody could be clearly observed at 30 frames/s inside the tumor through a dorsal skinfold chamber. We successfully identified six processes of delivery: initially in the circulation within a blood vessel, during extravasation, in the extracellular region, binding to HER2 on the cell membrane, moving from the cell membrane to the perinuclear region, and in the perinuclear region. The six processes were quantitatively analyzed to understand the rate-limiting constraints on Qdot-antibody delivery. The movement of the complexes at each stage was "stop-and-go." The image analysis of the delivery processes of single particles *in vivo* provides valuable information on antibody-conjugated therapeutic nanoparticles, which will be useful in increasing therapeutic efficacy. [Cancer Res 2007;67(3):1138–44]

## Introduction

Recent anticancer therapeutics based on active tumor targeting by conjugating tumor-specific antibodies has become of great interest in oncology, pharmacology, and nanomedicine. This approach will allow to increase therapeutic efficacy and to decrease systemic toxicity (1–3). Quantitative investigation of the dynamics of such delivery *in vivo* is crucial in enabling the development of more effective drug delivery systems. One of the best ways to do this is to apply a new technology in biophysics wherein the positions of proteins are detected quantitatively at the single molecule or particle level with nanometer precision (4). However, the specific processes of its delivery *in vivo* postinjection are not known at the single particle level. Conventional modalities of *in vivo* imaging such as computed tomography, magnetic

resonance imaging, positron emission tomography, and organic fluorescence or luminescence imaging have insufficient resolution to analyze the pharmacokinetics of drugs at the single particle level *in vivo* (5).

To address the issue, real-time single particle tracking using quantum dots (Qdots) has been applied to the study of drug delivery. Qdots, fluorescence nanocrystals, were thought to be as a suitable marker because of their intense brightness and stability, in contrast to organic dyes and green fluorescent protein (6–8). In cultured cells, single particle tracking has yielded invaluable information on the function of purified proteins (9–11). Recent work shows that the antibody-conjugated Qdots have allowed real-time tracking of single receptor molecules on the surface of live cells (12). However, no real-time single particle tracking in live animals has been reported, and it is uncertain that single particles of Qdots could be observed and tracked in live animals. The analysis of single molecules and particles in living animals is crucial to the understanding of the molecular mechanism of proteins *in vivo*.

This study was designed to analyze the movement of single functional Qdots in tumors of mice from a capillary vessel to cancer cells. To observe single Qdot particles in tumor tissue, we used a dorsal skinfold chamber model (13) and a high-resolution intravital imaging system. The imaging system, which consists of a confocal scanner unit with a Nipkow type disk and an electron multiplying charge coupled device (EMCCD) camera (14), facilitates the high-resolution *in vivo* single particle tracking at a video rate with a high spatial resolution of 30 nm. In addition, quantitative and qualitative information such as velocity, directionality, and transport mode was obtained using time-resolved trajectories of particles. As a result, we successfully identified the processes of delivery; these were quantitatively analyzed to understand the rate-limiting constraints on single Qdot-antibody delivery *in vivo*.

## Materials and Methods

**Qdot-antibody conjugation.** Qdot was conjugated to trastuzumab (Herceptin, Chugai Pharmaceuticals Co., Ltd., Tokyo, Japan) with a Qdot 800 Antibody Conjugation Kit (Quantum Dot Corp., Hayward, CA) coated with polyethylene glycol (PEG) amine (MW 2,000) according to the manufacturer's instruction. Briefly, Qdots are activated with the heterobifunctional cross-linker 4-(maleimidomethyl)-1-cyclohexanecarboxylic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (SMCC), yielding a maleimide-nanocrystal surface. Excess SMCC is removed by size exclusion chromatography. Antibody is then reduced and fragmented by DTT to expose free sulfhydryls, and excess DTT is removed by size exclusion chromatography. Then, activated Qdots are covalently coupled with reduced antibody and reaction is quenched with  $\beta$ -mercaptoethanol. The molar ratio of trastuzumab fragments to the Qdots at mixing is  $\sim 3:1$ . Conjugates are concentrated by ultrafiltration and purified by size exclusion chromatography. This active ester maleimide-mediated amine and sulfhydryl coupling (by SMCC) is a popular cross-linking reaction for various antibody conjugations. After this reduction,

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Hideo Higuchi, Biomedical Engineering Research Organization, Tohoku University, Engineering research Lab complex, 6-6-11 Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan. Phone: 81-22-795-4735; Fax: 81-22-795-5753; E-mail: [higuchi@tubero.tohoku.ac.jp](mailto:higuchi@tubero.tohoku.ac.jp).

©2007 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1185