

図1 ● 蛍光量子ドット (CdSe) を用いたモータータンパク質ダイニンの1分子ナノイメージング

A) 蛍光量子ドットをダイニン分子に結合し、蛍光像の強度分布をガウス分布でフィットさせて、蛍光輝点の位置を1ナノメートル精度で決定した。B) ダイニン1分子にCdSe量子ドットを付加し、その蛍光像の位置を経時的に解析した例

イメージングする技術を開発した。イメージング技術により、ナノ粒子のドラッグデリバリー過程を実時間で観察することやがん腫瘍の局在を観察することに成功した。

3. 観察精度がもっとも高い動物の筋肉の分子運動の観察

有機蛍光分子を用いた、1分子蛍光観察が日本で1995年に初めて成功した²⁾³⁾。この論文では筋肉モータータンパク質のミオシンに有機蛍光分子を結合し1分子を観察したばかりでなく、さらに蛍光分子をエネルギー源の分子であるATPに結合し1分子の化学反応を可視化するなど画期的な研究を行った。この観察方法を利用して1分子の蛍光をラベルしたモータータンパク質の運動が観察された。当時の蛍光の位置精度は50 nmほどしかなく、動いているか否かを検出するに過ぎなかった。位置精度を上げ、蛍光の位置の中心を1 nm程度の精度で測定できれば、分子の運動を直接イメージングできるはずである。

精度を上げるためには、顕微鏡の振動の減少、背景光の減少、イメージング装置のノイズの低減そして光子数を増加するなどのテクノロジーが必要である。振動の減少には、ナノ計測で培われたノウハウが活かされ、背景光の減少のためには、レーザーからの光を通さず、蛍光のみを透過する優れた光学フィルターが選ばれた。イメージング装置のノイズの低減と明るいイメージを得るためには、電子増幅するカメラが利用された。光子数の増加のためには、集光したレーザー光などにより、蛍光を励起する光を強くし、さらに蛍光強度の高いCdSe量子ドットを用いた。この量子ドットは直径3~6 nmとタンパク質程度の大きさをもちつつ、有機蛍光分子よりも数十倍明るい。さらに、量子ドットが分解するまでにカメラ上に到達する光子は合計1億個にもなり、有機蛍光分子の光子数の1,000倍に達する。1 nmの位置精度を得るためには、光子が10万個必要であるので、1億個であれば1,000フレームの画像を得ることができる。位置精度を10 nmに下げれば、10万

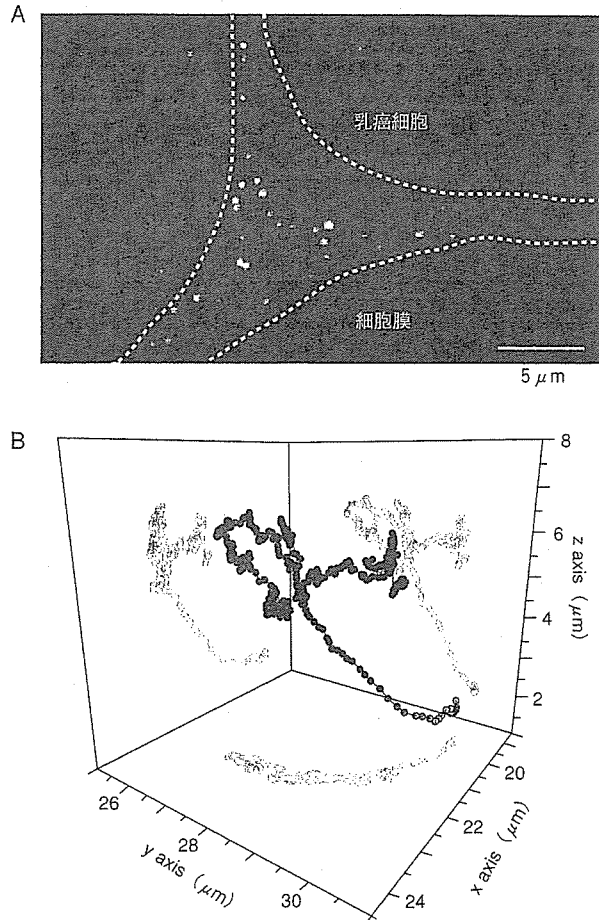


図2 ● 蛍光量子ドット-抗HER2抗体を取り込んだ乳がん細胞の蛍光共焦点イメージ

A) 細胞の輪郭は点線で描かれ、白い点を取り込まれた量子ドットを示している。B) 量子ドットの中心の位置を3次元的に追跡した。3次元画像は1秒間に3枚得られた

フレームとなり、ビデオレートなら約1時間(33ミリ秒×10万)イメージングが可能となる。この方法を利用して、細胞分裂や細胞輸送に関与するモータータンパク質であるダイニンやキネシンに量子ドット(CdSe)を結合して、1分子の運動を観察した。その結果、8 nmのステップが観察され、分子の機能をイメージングすることに成功した(図1)⁴⁾⁵⁾。

3. 量子ドットを用いた細胞内イメージング

細胞生物分野での量子ドットの分子イメージングは、1998年のBruchezらによる2種類の量子ドットを用いた培養細胞の核とアクチン繊維の蛍光2重染色に関する研究が始まる⁶⁾。以後、生細胞イメージングへも応用され、細胞内小器官の多色イメージングが行われるようになった。

われわれは、蛍光性ナノ粒子を用いて、運動

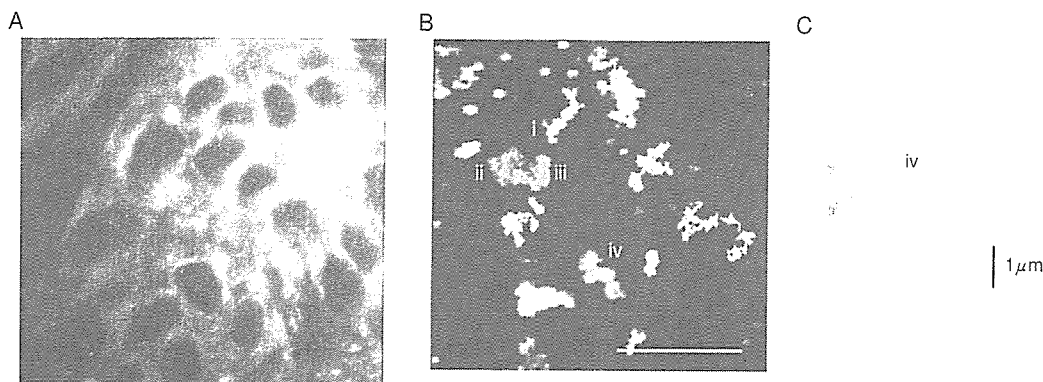


図3 ●細胞・組織を用いた免疫組織染色と生細胞の連続観察

A) マウスから取り出した腫瘍をホルマリン固定して、量子ドット-抗体複合体にて染色を行った。写真の1辺は60 μ mに相当する。B) 還元剤の2-メルカプトエタノールを含んだ培地にて生細胞に量子ドット-抗体複合体を反応させて、蛍光像を長フレーム(2,500枚)観察することができた。赤・青・黄・緑・橙で色をつけた領域は、量子ドットの軌跡を表す。C) B-I~IVの軌跡を拡大したもの

中の細胞表面の詳細な観測を試みた⁷⁾。乳がんの約30%では細胞膜上のレセプターHER2を過剰発現している。このタンパク質に対する抗体(抗HER2抗体)は、乳がん患者に投与される分子標的抗がん剤である。この抗HER2抗体を蛍光性量子ドットに化学架橋させた。これを乳がん細胞KPL-4と混合したところ、まず量子ドットは細胞膜に結合し、1時間ほどの間に、細胞内に膜ごと小胞を形成して取り込まれた(エンドサイトーシス)。その後、量子ドットを含んだ小胞は細胞内を細胞核に向けて輸送された。この小胞の運動をレーザー共焦点顕微鏡で蛍光観察を行った。対物レンズを上下にずらすことで、観察像の3次元像を取得し、新たに開発された装置にて解析した。330ミリ秒ごとに9枚の共焦点像を取得し、1つの3次元画像を構築した(図2-A)。そして、量子ドットの3次元位置を取得するため、蛍光強度を重みとした輝点の重心を計算するソフトウェアを開発した。細胞内において、モータータンパク質によって輸送されている量子ドットの位置の経時変化を3次元計測できた(分解能 \sim 10 nm)(図2-B)。さらに、その装置で、量子ドット-抗体

複合体が細胞膜から核付近に輸送される過程が、単一分子レベルでナノイメージングされた。現在では、細胞内のタンパク質や受容体の動態を2 nmかつ0.3ミリ秒の精度で解析することに成功し、ステップ状の運動を捉えることができた。

細胞生物学や医学における量子ドットの応用

細胞生物学や医学においては、客観的、かつ、高感度に細胞や組織を診断できる定量的手法の開発が必須である。細胞や組織の免疫染色法のために、蛍光量子ドットの優れた蛍光強度と安定性の利点を生かした方法を開発した⁸⁾。量子ドットに乳がん細胞に対する抗HER2抗体を結合させた。この量子ドット-抗体複合体を用いてホルマリンで固定した乳がん培養細胞と組織、および培養乳がん生細胞で免疫染色を行った。抗体の細胞や組織への非特異的な結合を抑えるために抗体を反応させる前にブロッキングを行う。従来法では、量子ドット-抗体複合体は非特異的な結合が多かったので、ブロッキング法を改良して、非特異的な結合を効率的に抑制した。これにより乳がん細胞に特異的な免疫染色観察

を高感度に行うことが可能となった。標本を緑色レーザーにて励起し、高感度カメラを備えた落射蛍光顕微鏡で蛍光画像を取得した(図3-A)。1時間観察しても、蛍光像はほとんど劣化しなかった。また、量子ドット単一粒子を容易に観察できた。このように、感度が高く安定な免疫染色が可能となった。

また、生きた細胞や組織の量子ドットを観察する際には単一量子ドットは1秒間に数回~数10回も明滅が起きてしまい、1つの粒子を連続的に観察することは従来困難であった。そこで、還元剤の2-メルカプトエタノールやグルタチオンをさまざまな濃度で、量子ドットの明滅を観測した。1~10mM程度の2-メルカプトエタノールやグルタチオンは明滅を抑えて、量子ドットが長時間連続的に蛍光を発することを可能にした。そこで、1 mM程度の2-メルカプトエタノール存在下で生きた細胞に結合した量子ドット-抗体複合体の挙動を単一粒子レベルで長時間連続的に観察できた(図3-B, C)。

本研究結果は、新しい病理学的手法のみならず、基礎医学、特に、生細胞における単一粒子解析やタンパク質動態の解析やナノドラッグデリバリーシステム(DDS)可視化など、薬理研究への貢献が期待される。

生きた細胞内での量子ドット単一粒子観察

量子ドットを用いたがんの診断への応用の基礎研究として、2004年にGaoらが前立腺がんマウスモデルを用いた抗体標識量子ドットによる生きたマウス内のがんのイメージングを行った⁹⁾。これにより、蛍光法を用いた新しいがんの診断方法の可能性が示唆された。一方、治療への応用としては、量子ドットを白血病に対する光線力学療法的光感受性薬剤として用いた研究が細胞レベルではあるが報告され、量子ドットが診断だけではなくがん治療にも応用可能であることが示唆された。

われわれは、生きたマウスの腫瘍内での抗HER2抗体結合量子ドットの単粒子追跡を行った¹⁰⁾。ポリエチレングリコールでコーティングされた量子ドットに、抗HER2抗体で標識して抗体をイメージングするためのプローブを作製し、それをHER2発現ヒト乳がん担がんマウスに尾静脈から投与した。投与後、腫瘍部へ集積することを確認し、高感度(ビデオレート、空間分解能30 nm)で、マウスの腫瘍血管から腫瘍細胞に到達する様子を捉え、その挙動を定量的に解析し得た。この研究は、効率的なドラッグデリバリーの発展のための強力な手法になりうることを示した。

近年の生命科学のイメージング分野

近年の生命科学のイメージング分野は、顕微鏡をベースとして、最新の光学の技術が導入され、発展を遂げている。しかし、生命の限られた環境で利用できる技術はごく限られている。さらに、人を含めた個体を扱う医学分野では、光の吸収や自家蛍光の問題があり、未だに、これらの問題は根本的には解決していない。しかし、光は非侵襲で高感度で診断や治療ができる可能性を有しており、今後ともたゆまなく発展すると期待される。今後、理工学分野の研究者が医学やバイオロジー分野の研究者と交流をすることによって、新しい医療が開かれることを期待する。

参考文献

- 1) 川合知二、監修：ナノテク活用技術のすべて：工業調査会、2002
- 2) 柳田敏雄、石渡信一：ナノピコスペースングのイメージング：吉岡書店、1997
- 3) 竹安邦夫、編：ナノバイオロジー：共立出版、2004
- 4) 鳥羽 菜、渡辺朋信、樋口秀男：「ナノメートル計測が拓く1分子の世界」バイオテクノロジージャーナル、6、600-604：羊土社、2006
- 5) Toba, S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 5741-5745, 2006.
- 6) Bruchez, M. Jr. et al. : Science, 281 : 2013-2016, 1998
- 7) 渡辺朋信、樋口秀男：ナノ学会第3回大会抄録集、p45, 2005

- 8) Li-Shishido, S. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 351 : 7-13, 2006
- 9) Gao, X. et al.: Nature Biotechnol., 22 : 969-976, 2004
- 10) 多田 寛, 樋口秀男, 渡邊朋信, 大内憲明: ナノ学会第3回大会抄録集, p177, 2005



樋口秀男 (Hideo Higuchi)

東北大学先進医工学研究機構教授。

1983年早稲田大学大学院理工学研究科物理学および応用物理学専攻修士課程修了。同年東京慈恵会医科大学第1生理学教室助手。1989年ペンシルバニア大学医学部助手兼任。1992年科学技術振興事業団柳田プロジェクト・グループリーダー。1997年東北大学大学院工学研究科金属工学専攻助教授。2004年より現職。理学博士。

現在の研究テーマは、タンパク質、細胞、マウスの単一分子のナノ計測、ナノイメージング。

渡邊朋信 (Tomonobu M. Watanabe)

2004年大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻博士後期課程修了。同年より東北大学先進医工学研究機構助手。博士(理学)。現在、細胞内、および、マウス内における蛍光量子ドットのナノ計測技術の開発に従事。

李 松花 (Songhua Li-Shishido)

2000年中国吉林省白求恩医科大学(現在吉林大学)医学部卒業。2003年東北大学大学院医学系研究科腫瘍外科学分野博士課程入学。研究テーマは、蛍光量子ドットを用いた乳がん細胞免疫染色法の開発に関する研究。

多田 寛 (Hiroshi Tada)

1999年秋田大学医学部卒業。2006年東北大学大学院医学系研究科腫瘍外科学分野博士課程修了医学博士。研究テーマは、マウスの単一分子のナノ計測。

大内憲明 (Noriaki Ohuchi)

1978年東北大学医学部卒業。1984年東北大学大学院医学研究科卒・医学博士。1984年米国国立がん研究所研究員。1987年仙台市立病院外科医長。1988年東北大学医学部助手。1995年東北大学医学部講師。1999年東北大学医学部教授。2002～2004年東北大学病院副院長を兼任。研究・専門テーマは腫瘍学、乳腺・内分泌外科、分子生物学、がん疫学、ナノメディシン。

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

武田元博, 小林芳男, 小林正樹, 桜井 遊, 中島護雄, 大内憲明

ナノテクノロジーは原子、分子およびその集合体であるクラスターの制御技術を中心に著しい進歩を遂げつつあり、さまざまな機能をもつナノ粒子が次々と開発されている。現在、医療は個別化、EBM (evidence based medicine) の普及を軸に大きな変革期を迎えている。ナノテクノロジーの著しい発展は、医療のこうした流れをデバイス開発・創薬の面から大きく加速させようとしている。センチネルリンパ節生検はがんの外科手術において、リンパ節郭清の侵襲を最小限にすることが可能な検査法であるが、従来用いられているラジオアイソトープ (RI) は施設によって使用制限があり、新しい方法が模索されている。われわれはクラスター制御技術によって従来のマーカーの欠点を改善し、センチネルリンパ節生検に最適な新しいリンパ節マーカーとして蛍光、X線、MRI 造影ナノ粒子をそれぞれ検討した。近い将来、それぞれの施設の事情に合わせ、最適なセンチネルリンパ節生検が選択されると考えられる。

はじめに

現在、がんの診療において個々の患者の病態に応じた治療法＝テイラーメイドメディスン (tailor made medicine) と根拠に基づく最良の治療＝エビデンスベースドメディスン (evidence based medicine) が求められている。そして、この時代の要求を背景に、がんに対する外科手術として、臓器温存手術やセンチネルリンパ節生検法が出現した。その結果、これらを支える画像診断がますます重要となり、特にがん局在診断のための画像検査は大きく進歩した。

1) 臓器温存手術の進展

臓器温存手術は腫瘍の正確な局在診断に基づいて、臓器を全摘せずに、がん病巣と周囲組織の、より小さな範囲の切除を行う方法であり、現在多くのがん手術に応用されている。その際極めて重要なのが、がんの局在診断である。固形がんの局在診断にはさまざまな画像計測法が用いられ、その中心となっているのがX線CTやMRIである。多くの場合、X線CTやMRIを行う際に造影剤が用いられる。それは、がん病巣では腫瘍血管が増生し、血管透過性が亢進するために造影剤による造影効果が得られやすく、病

巣の検出感度および特異度が著しく上昇するからである。従来から用いられる造影剤の造影効果は一過性であるが、もし術前から術中にいたるまでの一定の期間、造影効果を維持できれば、一度の造影で術前診断から術中の拡がり観察が可能であり、これまででない、精細な外科治療が期待できる。

2) センチネルリンパ節生検

一方、リンパ節郭清は、従来リンパ節転移の有無を確実に術前診断する方法がなかったために、転移の有無にかかわらずすべてのがん患者に行われてきた。それに対してセンチネルリンパ節生検は、リンパ流に沿って流れるマーカーを使用して、腫瘍周囲のリンパ経路を明らかにし、腫瘍に最も近いリンパ節を迅速病理診断することにより、転移の有無を診断する方法である。この検査結果をもとに、センチネルリンパ節に転移のある患者にのみリンパ節郭清を行い、転移のない患者のリンパ節郭清は省略できるため、より患者の病状に沿った治療が可能となる。

3) リンパ節の造影剤の開発

リンパ経路は、時に個々人のバリエーションがみられ、センチネルリンパ節が通常とは異なる

る場所に存在する場合もみられることから、センチネルリンパ節の存在を体外から検出する必要がある。体外診断可能な新しいセンチネルリンパ節生検法として、従来、ラジオアイソトープ法 (RI 法) が行われてきた。RI 法は、放射性物質を使用するため、施設に許可が必要であり、制約が大きい。そのため使用制限を受けない新しい方法が求められている。新たな方法として蛍光法、X線法、MRI 法などがこれまでに提唱されてきた。蛍光法、X線法、MRI 法の検討には、一般に使用される造影剤がリンパ節マーカーとして用いられている。例えば、蛍光試薬としてインドシアニングリーン、X線造影剤としてイオパミドールなどのヨード系造影剤、MRI 造影剤としてはガドリドールなどのガドリニウム系造影剤があげられる。これらの造影剤の多くは小分子またはキレート構造をとる物質であり、それぞれ粒子サイズが小さすぎるため、通常の血管造影の場合と同様、短時間でリンパ節を流れ去り、造影効果が持続しない欠点があった。センチネルリンパ節造影において造影剤がリンパ節に滞留するための最も重要な因子は粒子サイズである。ヒトにおいてはマーカーの粒径 50 ~ 100nm がセンチネルリンパ節生検に最適だと言われている。従来法における RI の担体はコロイドやアルブミンなどのタンパクであり、色素はそのものがクラスター構造となっている。そのため大きさはきわめて不均一であり不要な大きさの粒子も含まれる。もしリンパ節造影に必要とするサイズの粒子のみを用いることができれば、最小限の薬剤量で、より効率よくセンチネルリンパ節を検出できる。

④ バイオナノマーカーの開発

ナノメートルオーダーの物質制御技術は総称してナノテクノロジーと呼ばれ、現在この技術によってわれわれが思う通りの、もしくはこれまで想像もできなかった物質が次々と生み出されている。これは物質を作るための化学技術が熟成したばかりでなく、スーパーコンピュータ

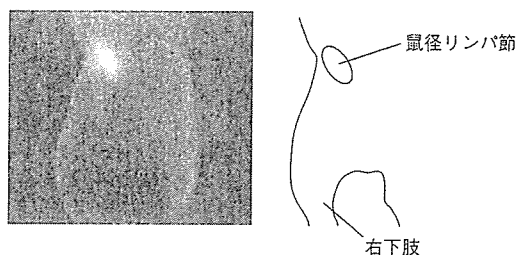


図 1 ● 蛍光ナノ粒子の体外検出

ラット右足背にポリスチレン蛍光ナノビーズを皮下注射した後の鼠径部蛍光画像

による分子設計や、超高温、高压条件下で物質を作製する超臨界条件での物質合成など、これまでの物質合成の枠を超えた技術の進歩が総合的に物質合成に関する化学・制御技術を押し上げたのに他ならない。本稿では現在までにわれわれが検討・開発したバイオナノマーカー、そのうち特にセンチネルリンパ節生検への応用について述べる。

⑤ 量子ドットを用いたマーカー

幅広い応用が期待され、現在も新たな応用が次々と考案されている蛍光ナノ粒子として、量子ドットがあげられる。すでに市販されているものもあるが、量子ドットは従来の蛍光色素にはない優れた特徴をもつ。その理由は、①蛍光強度が従来の蛍光色素の 20 ~ 30 倍、②耐光性に優れる、③特定の励起波長を要せず、蛍光波長より短い波長であれば、どの波長でも励起可能であるため、従来の蛍光色素に比べて蛍光波長と干渉しない、④離れた励起波長を選択でき、より高感度計測が可能なことなどである。

また、蛍光色素を混入したポリスチレンビーズも蛍光ナノ粒子として利用可能である。蛍光ビーズは量子ドットに比べて蛍光強度や耐光性に劣るものの、いくつかのサイズが用意され、それぞれの粒径は非常に均一である。そのためセンチネルリンパ節生検に最適な粒径を検討す

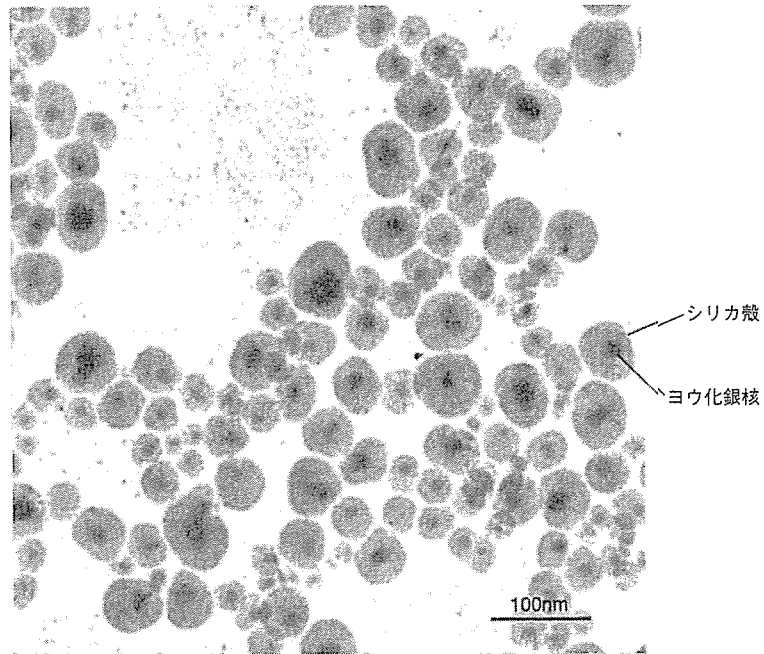


図2 ●シリカコーティングナノサイズヨウ化銀ビーズ (透過型電顕像)

るうえで有用である。

ラット足背に蛍光ポリスチレンビーズ懸濁液を皮下注射し、鼠径部を蛍光検出し、最適な粒径および蛍光波長を検討したところ、粒径40nm、蛍光波長700nm以上が生体の蛍光センチネルリンパ節生検に有用であることがわかった(図1)¹⁾。蛍光ナノビーズを医療応用する場合、そのままでは量子ドットはカドミウムやセレン、蛍光ナノビーズでは有機蛍光色素が溶出する懸念が指摘されており、何らかの対策を講ずる必要がある。われわれはこれらのナノ粒子をシリカコーティングする方法を開発した。物理的・化学的に安定なシリカを隔壁として生体との接触を回避することを考えたのである。またシリカコーティングによって蛍光寿命の延長など、蛍光特性の改善も得ることができた²⁾。

2. X線造影剤の開発状況

X線法によるセンチネルリンパ節生検において

も同様に、造影剤粒子は大きさが一定である事が望ましい。われわれは新しいX線造影剤として、ナノサイズヨウ化銀ビーズをシリカコーティングした造影剤を独自に開発した(図2)³⁾。ラット足背皮下にナノサイズヨウ化銀ビーズ懸濁液を皮下注射したところ、本造影剤により鼠径部センチネルリンパ節のCT値の上昇を認めた(図3)⁴⁾。現在のところ、粒径がやや大きく不均一であるなどの問題点があり、今後の臨床応用を考えた場合、粒径の更なる縮小・均一化を図り、センチネルリンパ節への集積濃度を上げる必要がある。また、体内分布や排泄経路を明らかにして体内蓄積や長期毒性の懸念を払拭しなければならない。現在われわれは体内分布を明らかにするため、ナノサイズヨウ化銀ビーズ投与後の各臓器の透過型電子顕微鏡(transmission electron microscope: TEM)撮影を行っている。これまでに臓器内や血管内に存在するヨウ化銀ビーズをTEMで確認できた⁴⁾。

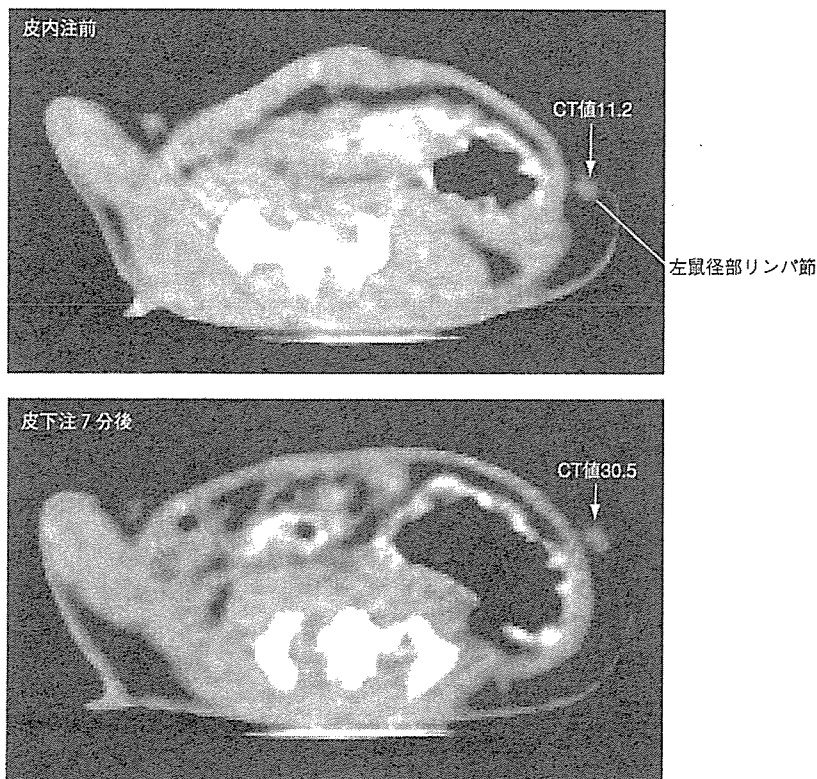


図3 ●シリカコーティングヨウ化銀ビーズによるセンチネルリンパ節造影効果

3. MRI 造影剤の開発状況

常磁性元素であるガドリニウムの造影効果は、ガドリニウムがプロトンに接触して緩和時間を延長することによって得られる。ガドリニウムは単体でコロイドを形成し難いので、シリカクラスターを作製し、その表面をガドリニウムでコーティングした。MRIで撮像したところ、T1強調画像で水に比べて高信号を発した(図4)⁹⁾。今後、生体に投与するためには、さらにシリカコーティングによる安全性確保が必要であるが、その場合、シリカ層によって周囲のプロトンとの距離が開き、信号強度低下が考えられるため、現在、シリカコーティングを行い、さらに動物を用いた造影能の評価を行っている。

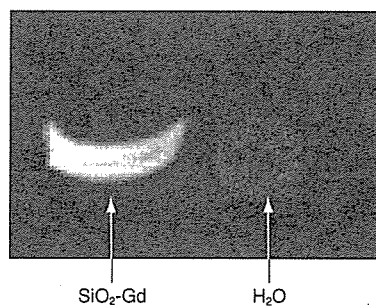


図4 ●ガドリニウムナノシリカナノ粒子のMRI画像 (T1 強調)

まとめ

現在までに、ヨウ化銀ビーズ、ガドリニウムナノ粒子に適度なサイズを与えることで、センチネルリンパ節にマーカーを一定時間滞留させ得ることが明らかになった。予備的実験ではヨウ化銀ビーズは投与後、数日間造影効果を持続することがわかっている。このようにナノテクノロジーによって最適な性質を造影剤に与えることで、センチネルリンパ節生検法の可能性を大きく広げることができる。従来のRI法は使用に施設毎の許可が必要であり、すべての施設で使用できるわけではなく、センチネルリンパ節生検の普及の妨げになると考えられてきた。今後、RI法に固執することなく、さまざまな方法のなかからセンチネルリンパ節生検を選択できれば、RI法を行うことのできない施設においてもそれぞれの施設の事情に合った方法を行うことができ、センチネルリンパ節生検の普及が大きく進むものと考えられる。

ナノメートルオーダーの物質制御技術は、目的とするナノクラスターに大きさばかりでなく、さまざまな機能を付与することができる。物質のマーキング機能、抗体機能や、ドラッグデリバリー機能、コーティングによる周囲との隔絶・分散性の向上など枚挙にいとまがない。今

回紹介したナノマーカーもこれらの機能をさらに付与することが可能であり、さらに幅広い応用が期待できる。今後、基礎から臨床に及ぶ医学領域のニーズに基づいて、高分子・低分子化学合成技術の熟成や超臨界状態での物質合成技術の進歩、スーパーコンピュータによる分子設計・構造解析などが進み、幅広い工学分野から、さらに革新的な手法が次々と登場すると考えられる。ナノテクノロジーの産物を医療応用する場合に最も大切なことは、機能性ナノ粒子が有用であることはもちろんであるが、安全に使用できることに尽きる。そのためには細胞や動物実験を通した至適投与量の確立と体内動態・分布の解明、さらに排泄経路の確保が必要である。ナノ粒子の実用化はこうした技術開発の積み重ねによってのみ実現され得るのであり、基礎工学から臨床医学にわたる、幅広い分野の研究者の協力が必須である。

参考文献

- 1) Nakajima, M. et al.: Cancer Sci, 96: 353-356, 2005
- 2) Kobayashi, Y. et al.: e-Polymers, 052, 2005
- 3) Kobayashi, Y.: Colloids and Surfaces A, 251: 197-201, 2004
- 4) Sakurai, Y. et al.: Breast Disease, 25: 55-56, 2006
- 5) Takeda, M. et al.: Breast Disease, 25: 47, 2006



武田元博 (Motohiro Takeda)

東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻、大学院医学系研究科腫瘍外科学分野、助教授

1987年東北大学医学部卒業、2001年東北大学病院助手、2005年より現職。

研究・専門テーマは乳腺外科、ナノテクノロジーの医療応用。

C201

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

多田 寛[○] (東北大学腫瘍外科)、樋口秀男 (東北大学先進医工学機構)

渡邊朋信 (東北大学先進医工学機構)、大内憲明 (東北大学腫瘍外科)

In vivo imaging of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice

Hiroshi TADA, Hideo HIGUCHI, Tomonobu WATANABE and Noriaki OHUCHI

ABSTRACT

Quantum dot (Qdot) is nanometer-sized crystals which improved brightness, resistance against photobleaching compared with organic dyes and fluorescent proteins. Therefore, Qdot is thought to become new adjuncts of fluorescent bioprobes for medical applications, especially for cancer imaging^{1,2}. We have used Qdot conjugated with monoclonal anti-HER2 (human epithelial growth factor type 2) antibody (Trastuzumab) for molecular imaging of breast cancer cells. We utilized poly ethylene glycol (PEG) coated Qdot-Trastuzumab complex to label a cell membrane of the HER2 overexpressing breast cancer cells. Using this complex, we established the *in vivo* fluorescent cancer imaging method. After injection of the Qdot-Trastuzumab complex to the human breast cancer xenograft mouse model, the accumulation of Qdot to the tumor tissue was clearly observed at subcellular resolution with the original 3D intravital microscopic system. Furthermore, We report the tracking of single particles of quantum dots conjugated with trastuzumab in living mice. This suggests that we can eventually develop a novel cancer imaging and drug tracking system.

Keywords: In vivo imaging, Quantum dot, Breast cancer

1. 緒 論

ナノメートルオーダーの粒子作製技術は目覚ましいものがあり、それらが持つ顕著な特性は、様々な分野への応用、特に医療分野への応用が期待されている^{1,2}。その技術によって作られた蛍光ナノ粒子である蛍光性量子ドット (quantum dot: 以下 Qdot) は、従来の有機系蛍光色素と比較し、蛍光強度が強い、耐光性が高いなどの優れた蛍光特性を持つため、今まで為しえなかった生体内での安定した蛍光イメージングが可能になると考えられる。

一方、生きたままの実験動物を用いた生体内イメージング、いわゆる *in vivo* イメージング法は、その迅速性、簡便性、汎用性から、生物学全般、特に癌研究における動物実験デザインを急速に変化させつつある。*in vivo* イメージングは、生体光学 (バイオフォトンクス) 技術が中心で、主に Green fluorescence protein (GFP) などの有機系蛍光色素やホタル由来の発光酵素であるルシフェラーゼを用いて行われてきた。それぞれ既に確立された手法であり、遺伝子導入可能などの種々の利点はあるが、これらの方法では、蛍光強度や褪色の問題から、生体内での安定した高解像度傾向イメージングは困難である。しかし、蛍光物質として Qdot を用いることでより安

定した高感度観察が可能になると考えられる。生体内での粒子の動きや局在を単粒子レベルで観察することができれば、従来は平均化してしか捕らえられなかった粒子の真の挙動をリアルタイムで追跡することが出来、この方法によってしか得られない粒子の真の挙動を捕らえることが可能である。

従来の生物・医療分野で行われてきたイメージング手法としては、X線CTやMRI、PETなどがあり確立された優れた方法であるが、分解能では蛍光イメージング法が勝る。蛍光イメージングの中でも、Qdotを用いた方法が一番優れており、Qdotによる蛍光法を用いた *in vivo* イメージングは、現在のところ最高感度の手法と思われる。それ故、本方法は生物学、腫瘍学、薬学の分野において非常に重要な手法に成り得るとと思われる。

生体組織を高分解能でイメージングするため、我々は、ピエゾアクチュエーターを備えた対物レンズを用いて、ビデオフレームと同期させて顕微焦点を変化させられる共焦点顕微鏡システムを作製した。

今回我々は、これらの技術を組み合わせ、臨床医学の場で分子標的治療薬として使用され HER2 発現乳癌細胞に結合するトラスツズマブを Qdot に標識したものを HER2 発現乳癌担癌マウスに経静脈的に投与し、今まで為

しえなかった生体内での高感度 in vivo 蛍光イメージングを行った。

参考文献

- 1) Dahan, M. et al. *Sci.* 302 (2003), pp442-445
- 2) Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al. *Nat. Biotechnol.* 22(2004), pp969-976.

2. 材料と方法

Qdot(Quantum dot® 800, Quantum dot 社, Hayward, CA) に、抗 HER2 モノクローナル抗体であるトラスツズマブを結合させて複合体 (QT-complex) を作製する。それを HER2 発現乳癌担癌ヌードマウス(Balb C nu/nu、移植乳癌細胞株: KPK-4) に投与し、高感度観察系を用いて、皮弁作製して腫瘍組織を直接観察し、腫瘍の QT-complex 単粒子のイメージングを行った。

3. 結果・考察

HER2 発現乳癌担癌マウスモデルに、QT-complex を経静脈的に投与したあと、皮弁を通して、QT-complex 単粒子が乳癌細胞に結合していく様子を 0.033 秒・30nm の時間・空間分解能で追跡し得た。QT-complex 投与 6 時間後に腫瘍を観察したところ、細胞の輪郭外から細胞膜に結合した。その後、細胞膜上で多くの QT-complex の動きは制限されていたが、突然、細胞膜に沿って一方向性に 400-700nm/sec の速度で動く様子も観察された (fig. 1)。この挙動は、観察系によって生み出される 50 μ m 以下のノイズによる輝点の移動よりも大きな挙動であり、ノイズ以外によって生み出された動きであり、アクチンフィラメントなどのフレキシブルな細胞骨格に付着している HER2 によるものであることを示す。

4. 結語

生体腫瘍内での Qdot-抗体単粒子の挙動を 0.033 秒・30nm の時間・空間分解能で追跡することに成功した。本研究により、in vivo で蛍光法による高分解能での薬物追跡が可能となった。

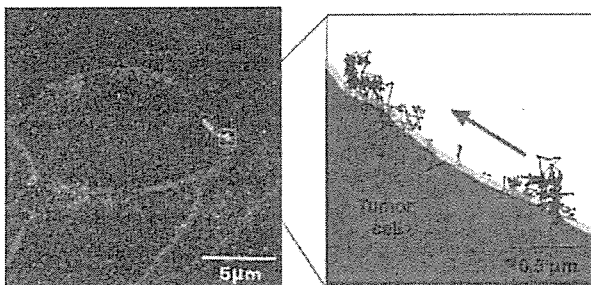


Fig.1 生体内蛍光単粒子追跡

医工連携のための技術者再教育プロジェクト (医学からみた)

Recurrent Education for Engineers to Improve Medical Engineering Collaborations

執筆者プロフィール



武田 元博
Motohiro TAKEDA

1987年東北大学医学部卒業, 2001年東北大学病院助手, 2005年より現職
 ◎研究・専門テーマは乳腺外科, ナノテクノロジー
 ◎東北大学助教授 大学院工学研究科 バイオリボティクス専攻 大学院医学系研究科 腫瘍外科学分野
 (〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1/
 E-mail: motot@d1.dion.ne.jp)

1. 工学技術の発展と医学・医療

医学・医療は伝統的な経験に加え, 常に新しい科学技術の成果を導入することによって進歩してきた。医療はヒトの病気を治し, 命を救うというきわめて現実的な目的をもって行われることから, 最新の技術を取り入れ, 患者の体の負担がより小さく確実な診断・治療法を追求するのはごく自然なことである。科学技術は特に 20 世紀後半から著しく進歩し, 医学・医療に大きな影響を与えた。生化学分野, 工学分野の技術が大きく取り入れられ, 生化学分野からは遺伝子解析技術の導入による病態の解明と治療法の開発, 工学分野からは, さまざまな物理的計測法を生体計測に導入することによって CT・MRI など, 画像計測技術が大きく進歩した。画像計測技術は三次元再構築技術の進歩もあいまって医療の画像診断法を根底から変えた。21 世紀に入り, 工学は医学の中でさらに重要な位置を占めるにいたっている。

新たな技術の医学・医療への導入には医学者・工学者のそれぞれ工学・医学に対する理解が重要であることはいまでもないことである。近世に至るまでは科学技術・医療ともに直観的に理解可能であり, 工学者, 医療者双方にとってお互いに理解困難なものではなかった。しかし近年

両分野の進歩は著しく, それぞれ複雑に細分化, 高度化しており, 専門教育なしでお互いに簡単に理解することが困難となっている。工学分野の技術を医療に取り入れる際, 医・工双方の研究者はお互いに共通の言葉で議論する必要があるが, それぞれの分野の高度な専門化のためにますます困難となった。お互いの溝を埋めるべくお互いの早急な分野横断的再教育が望まれる。

医工両分野の溝を埋め, 工学分野から医学・医療に技術革新を効率よくもたらすべく発足した Recurrent Education for Development of Engineering Enhanced Medicine プロジェクト (以下, REDEEM プロジェクト) が始まって 1 年になる。本稿では医工連携を円滑に進める上で必要な医学知識を社会人として医療用装置開発に携わる工学技術者に再教育する, 東北大学における新しい試みである REDEEM プロジェクトを, これまでの成果を交えて医学の立場から概説したい。

2. REDEEMプロジェクトにおける基礎から臨床までの医学教育

東北大学 REDEEM プロジェクトは文部科学省による平成 16 年度科学技術振興調整費 新興分野人材養成プログラムに採択され, 学内に医療工学人材育成委員会を設置し, 「医療工学技術者創成のための再教育システム (Recurrent Education for Development of Engineering Enhanced Medicine = REDEEM)」の名称を与えられて実施されている。その目的は, すでに大学で工学分野の専門教育を受け, 修士レベルの知識・専門性を有し, 実地に医療用装置などの開発に携わっている社会人を中心に医学教育を行うことで, 医工学連携をより円滑かつ強力に推し進めることである。

現在医療技術開発において, もっとも大きな障壁がいわゆる「言葉の壁」, 「意識の壁」である。医師が普段の仕事の中で何気なく使用している基本的用語や専門化された医学の内容がわからないことから, 医師の側からの要請, 言葉のニュアンスが理解できにくく, 必要以上に大きな心理

的障壁となっているのが現状である。本プロジェクトでは、座学による単なる知識の詰め込みではなく、集中講義に続いて実習を受けることによって遺伝子、細胞、生き物を自ら操作し、学び取ることに主眼を置いている。もちろん講習期間が2週間に限られているためすべてを完全に網羅することは不可能であるが、講義による座学のみでは習得し得ない、医学実験の雰囲気、具体的にどのような実験を行っているかを目の当たりにすることができ、生物の仕組みを理解するとともに、心理的な障壁を取り去ることが期待できる。

講習期間は集中講義5日間、実習5日間である。集中講義では医学系基礎科目として生物学、分子細胞生物学、生命工学を、医学科目として、解剖組織学、人体生理学、内科診断学、外科治療学、画像診断学を、そのほかに工学科目として、生体力学、生体材料学、細胞工学、医療統計学、数値シミュレーション、データベースを、医療関連の科目として、医療法制、リスクマネジメント、生命倫理、事業化などの講義を行っている。これら講義に続いて、分子生物学・細胞生物学、生理・解剖学など、基礎医学実習が行われ、工学者が実体験として医学のエッセンスを学べるようにプログラムが組まれている。なお、それぞれの科目について到達目標を設定、講義・実習前後での理解度についてアンケート調査を行い、目標到達の度合いを評価できるようにした。

3. 平成16年度講義・実習の結果

実習風景を図1に、平成16年度のアンケートより講義・実習全体の理解度自己評価の変化を表1、2に示す。5段階にわけられた理解度は、講義全体で1.77から2.97〔表1(a)〕、実習全体で1.64から3.25〔表1(b)〕と講義後に大幅に上昇していることがわかる。講義・実習により心理的障壁が大きく取り払われたことが伺える。また、アンケートから、講義受講後に実習を受けたことで、医学を学ぶ意欲をより強くした受講者が多く見られた。本プロジェクトは工学者の医学知識の習得のみならず新たな意欲を引き出し、結果としてより積極的な医工連携研究への参加を推し進める効果も期待できる。

4. 再教育の場のあり方と今後の分野横断的教育の展望

本プロジェクトが対象とする受講者の多くは、実際に医工連携のもとに医療用装置の開発を行っていて、医学教育の必要性を実感している社会人である。こういった意味から自らの仕事上の問題意識が高い社会人のほうが、まだ専門性を確立していない段階の、具体的な仕事の目標を持たない大学生から博士課程の大学院生に対する教育に比べ、



図1 実習風景

表1 受講前後での理解度自己評価の変化

(a) 講義

科目	理解度		変化幅	変化率
	受講前	受講後		
生物学	2.13	3.40	+1.27	+59%
分子細胞生物学	1.88	3.01	+1.13	+60%
人体の構造と機能	1.69	2.86	+1.17	+69%
内科診断学	1.56	2.87	+1.31	+84%
外科治療学	1.51	2.89	+1.39	+92%
生体力学	1.86	2.76	+0.90	+48%
講義全体 (6科目平均)	1.77	2.97	+1.19	+67%

(b) 実習

科目	理解度		変化幅	変化率
	受講前	受講後		
分子生物学	1.79	3.32	+1.53	+85%
細胞生物学	1.78	3.28	+1.50	+84%
生理学	1.55	3.25	+1.70	+110%
解剖学	1.44	3.17	+1.72	+119%
実習全体 (4科目平均)	1.64	3.25	1.61	+98%

※受講者による5段階での自己評価の平均値により算出

効果がより高いと考えられる。

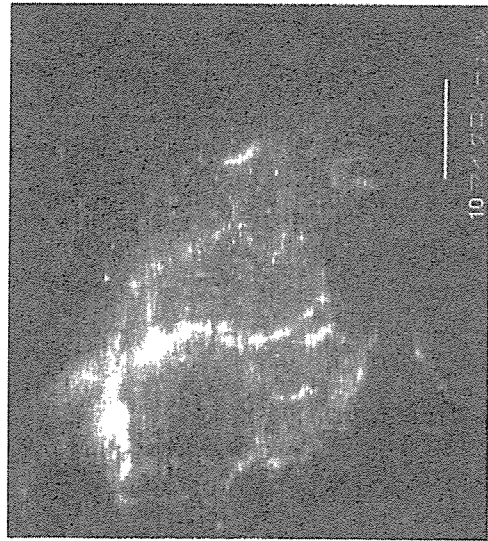
本プロジェクトのような再教育を行うための設備と人的資源を単独で持つ組織は現在のところ総合大学のみである。現在、我が国では地方レベルからの産業育成が強く望まれており、今後各地域の大学がこのような卒業教育プログラムを構築し、医工連携を推し進め、地方の産業振興を推進する力となることが期待される。

近年、医療の場では科学的根拠に基づく医療や個々の患者の病態に応じた医療などこれまでにない大きな潮流が医療を変えつつある。特に個々の患者の病態に応じた医療は個々の患者の精密な病態把握が要求されるため、特に医療工学による技術革新が必要である。

今後医工連携のますますの緊密化によって、診断・治療技術が飛躍的に進歩することを期待してやまない。

(原稿受付 2005年8月29日)

抗がん剤動き把握



最も早い場合、粒子は対する副作用を抑制した
 投与から約十分でがん製剤の改良といった研究
 細胞に達し、約1時間でに加え、がん細胞が転移
 一定量の抗がん剤が到したかどうかを診断する
 達。血管や正常な細胞、技術にも役立つ可能性が
 繊維組織をすり抜けるあるという。
 に時間を要することや、樋口教授は「分子レ
 その経路も分かった。ルでがん細胞の範囲が確
 観測装置は既存の顕微認できるようになれば、
 患部の手術では切欠が最
 抗がん剤と結合し、発光小限で済むなど、患者の
 して見えるがん細胞(マ負担も減らせるのではな
 イクロは100万分の1いか」と話している。
 で、ナノの1000倍) 成果は米国のがん研究
 樋口東北大学教授提供 専門誌で発表した。

分子レベル画像化

東北大 効率的治療に道

東北大先進医学研究
 機構の樋口秀男教授(バ
 イオイメージング学)ら
 の研究グループは、抗がん
 剤ががん細胞に到達す
 るまでの様子を分子レ
 ルで画像で確認すること
 に成功した。効率的なが
 ん治療につながる技術
 として注目されそうだ。

使用した抗がん剤は乳
 がんの治療薬「トラスツ
 ズマ」で、がん細胞を
 増殖させる異常タンパク
 質「HER2」の抗体。
 細胞表面でHER2と結
 合し、がん細胞の遺伝子
 に働き掛けて増殖を抑え
 る効果がある。
 グループは、直径約十

ナメータは十億分の二
 の抗がん剤一分子にし
 ーザー光を当てると赤外
 線を発する半導体「単光
 ナノ粒子」(直径約五ア
 ン)を結合させ、マウス
 の静脈に投与。ナノ粒子
 の軌跡を観測することで
 抗がん剤の動きをとら
 えた。

鏡や超音波カメラを組
 み合わせ、光を検出する
 精度や振動制御機能を向
 上させた。取り込んだデ
 ータを3次元で動画処理
 するソフトも開発した。
 乳がん以外の抗がん剤
 にも応用が可能で、薬剤
 ががん細胞に到達する時
 間の短縮や、正常細胞に

河北新報

河北新報社
 仙台市青葉区五橋1-2-28
 (郵便番号 980-8660)