

2007/2017A

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業
ナノメディスン研究

生体超微細 1 分子可視化技術によるナノ DDS と
がん標的治療に関する研究 (H18-ナノ-一般-001)

平成19年度 総括・分担研究年度終了報告書

主任研究者 大内 憲 明

平成 20 (2008) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- 生体超微細1分子可視化技術によるナノDDSとがん標的治療に関する研究 1
大内 憲明

II. 分担研究報告

1. 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 13
武田 元博、亀井 尚、桜井 遊、河合賢朗、甘利 正和、仲田 栄子
2. 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 22
川添 良幸、水関 博志
3. 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 ... 27
権田 幸祐
4. 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 31
小林 正樹
5. X線造影用ヨード系ナノ粒子の amine-free および追添加シリカカプセル化法の開発に
関する研究 35
小林 芳男
6. ナノサイズ・センシングカプセルの新規開発と医療応用：バイオマーカ作製 ... 39
粕谷 厚生
7. 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 42
名嘉 尚

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 別紙1 雑誌論文 45
- 別紙2 書籍 47
- 別紙3 学会発表 48

IV. 研究成果の刊行物・別刷 51

I. 総括研究報告

生体超微細 1 分子可視化技術によるナノ DDS とがん標的治療に関する研究

（主任）研究者 大内 憲明 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

機能性ナノ粒子を用いたナノからマクロレベルの生体イメージングを実現すべく、新規開発した高感度計測装置による計測を中心として、以下の研究を行った。

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRI ナノマーカの開発

①. ナノサイズヨウ化銀ビーズの体内分布をX線CT、TEMに加え、誘導結合プラズマ法で初めて定量計測し、肝細胞への取り込み並びに胆汁中への移行を認めた（第108回日本外科学会、2007、TOPIM、2008）。

②. 昨年開発したガドリニウム粒子に改良を加え、MRI造影剤として使用可能な3重構造のガドリニウムナノ粒子を世界で初めて作製した（Colloids and Surfaces A, 2007）。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細 in vivo イメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察

①. 量子ドットでラベルした抗乳がん抗体トラスツズマブの in vivo 単粒子イメージングに成功した（Cancer Res, 2007）。

②. 腫瘍における各サイズのナノ粒子の動態を1粒子レベルで初めて明らかにした（TOPIM 2008）。

3. 生体における腫瘍タンパク分子標的マッピング技術に基づく外科治療の確立

①. 深部組織蛍光マーカ検出に不可欠な超音波蛍光検出法の開発に成功した（Appl. Phys. Lett, 2006）。

②. 蛍光ナノ粒子のシリカコーティング並びに動物をモデルとしたセンチネルリンパ節検出に初めて成功した。

今回、生体内における量子ドット、蛍光ナノ粒子のサイズ毎の動態の違いを1粒子レベルで初めて観察した。この結果から、高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細 in vivo イメージング法は腫瘍におけるDDSを決める上で極めて有用な技術である。また同様に、生体内および細胞内における薬物の動態や作用、さらに生体のシグナル伝達を直接観察し得ることから、生体の様々な分子機構やメカニズムの解明に大きく寄与できるものと考えられる。また、がんの分子標的マッピングに基づく外科治療を行う際に不可欠な、深部に位置する病変を蛍光計測で検出し得る技術とともに安全に使用しうるシリカコーティング蛍光ナノ粒子を用いた生体計測に成功したことは大きな進歩と言える。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名：武田元博（東北大学工学研究科、准教授）、川添良幸（東北大学金属材料研究所、教授）、粕谷厚生（東北大学国際科学国際高等研究センター、教授）、小林正樹（東北工業大学、教授）、水関博志（東北大学金属材料研究所、准教授）、名嘉

尚（東北大学多元物質科学研究所、准教授）、権田幸祐（東北大学先進医工学研究機構、助教）、小林芳男（茨城大学工学部、教授）、亀井 尚（東北大学病院、助教）、甘利正和（東北大学病院、助教）、仲田栄子（東北大学保健学科、助教）多田 寛（宮城県立がんセンター、医長）、桜井

遊（東北大学医学系研究科、助教）、河合賢朗（東北大学医学系研究科、助教）、魚森昌彦（東レ・ダウコーニング（株））

A 研究目的

現在様々な機能を持つナノ粒子が作製され、多様な医療応用が試みられている。我々はこれまで機能性ナノ粒子を新規作製し、単粒子イメージング、外科治療への応用を目指した装置開発を行ってきた。機能性ナノ粒子の一つとして、ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ビーズを作製し、有用性を実証するとともにTEMを用いて体内動態を明らかにした。また、蛍光ナノ粒子を用いた *in vivo* 1分子計測に成功した。我々は、次の段階としてシリカコーティングヨウ化銀ビーズの血管内投与後の体内動態を詳細に検討すべく、誘導結合プラズマ法で各臓器の銀元素を定量計測した。一方、機能性ナノ粒子を対象とした高感度な計測装置として、単粒子蛍光イメージングが可能な三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムおよび超音波変調蛍光計測システムの開発に取り組み、蛍光ナノ粒子1粒子並びに深部の対象の蛍光計測を実現した。今回、異なるサイズの機能性ナノ粒子の腫瘍間質内動態の解明、および生体適応可能な蛍光ナノ粒子の作製を主な目的に据えて研究を進めた。

B 研究方法

上記目的のために、ナノマーカ開発グループ（川添、水関、粕谷、小林芳ら）、単粒子検出グループ（権田、多田、河合ら）、臨床応用グループ（武田、小林正

樹、甘利、亀井、仲田、桜井ら）をそれぞれ形成し、下記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蛍光・X線・MRIナノマーカ開発（小林芳男、名嘉、川添、水関、粕谷ら）：これまで我々が作製した、シリカコーティングヨウ化銀ビーズの体内動態、安全性を確立するため、静脈内投与後、CT撮影・透過型電子顕微鏡（TEM）観察を行い、腎、心、肺、脾についてヨウ化銀ビーズの存在を確認し、さらに誘導結合プラズマ法により各臓器に残存する元素の定量計測を行った。ヨウ化銀ビーズはシリカコーティングにより特異な二重構造をとっているためTEMによる観察が容易である。また安全性試験として、ナノサイズヨウ化銀ビーズの量を変えて静脈投与し、死亡率を評価した。

光線力学療法（Photodynamic therapy (PDT))は腫瘍学や眼科学などの医療分野において異なるタイプの患部、腫瘍に対する非侵襲的治療方法として注目を集めている。ヘマトポルフィリンは最初の、それと同時に今でも最も使われている光線力学治療薬（PDT薬剤）であるが、PDT活性を示す正確な異性体構造とヘマトポルフィリン同士の結合様式との関係はいまだに議論がなされており、確定していないのが現状である。今回Density Functional Theory/Time Dependent Density Functional Theory (DFT/TDDFT, 密度汎関数理論、時間依存密度汎関数理論)を用いて、ヘマトポルフィリンダイマーの安定な構造を求めた。

新たなMRI造影剤として、昨年度作製したガドリニウムナノ粒子は表面にガドリニウムが露出しているため、小林芳らにより更にその表面をシリカコーティングし、MRIにてその信号強度を確認した。

また、従来シリカカプセル化の際に触媒としてアミンが用いられてきたが、アミンは生体に対して有毒であるため、本研究では、アミン系触媒を用いないamine-freeシリカコーティング法に取り組んだ。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察（渡邊、多田、権田）：抗がん剤DDS研究のモデルとして、粒径20nm、40nm、100nmの各サイズの蛍光ナノ粒子懸濁液を担がんマウスに静脈注射し、腫瘍間質におけるナノ粒子の挙動を観察した。三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムを用い、dorsal skin fold chamberを形成して腫瘍を窓越しに観察可能とし、腫瘍血管、腫瘍組織、腫瘍細胞を経時的に観察し、挙動の様式を各サイズ毎に解析した。また高転移性がん細胞を蛍光ナノ粒子でラベルし、三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムを用いることにより、がん細胞が腫瘍間質内を移動する様子を逐次観察した。

3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立（武田、小林正樹、甘利、亀井、仲田ら）：

悪性腫瘍に対する外科治療の基本は完全な切除である。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、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、しばしば病理診断で断端陽性となる。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を行うことが必要である。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、病理医の負担を軽減させることもできる。そのためには腫瘍病変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程度と浅く、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り、病巣は必ずしも計測表面に存在するわけではなく、多くの場合体表からは同定できない隠れた病変の探索に用いられることが想定されるため、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。昨年度、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に成功した。本年度はより生体に近いものとして市販の食肉に蛍光色素を包埋し、蛍光検出を試みた。また実用化に向けた装置の改良に取り組んだ。

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. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRIナノマーカの開発 (小林芳男、名嘉、川添、水関、粕谷ら) : ポルフィリン誘導体のエーテル結合のダイマーは2つのポルフィリンリング間の $\pi-\pi$ 相互作用により安定化していることが、その安定状態の構造解析から明らかになった。

ヨウ化銀ビーズの体内動態を詳細に解析するため、ラットにヨウ化銀ビーズを静脈注射直後にX線CTで撮像し、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ビーズの分布を観察、ならびに各臓器、胆汁、尿について誘導結合プラズマ法により銀の定量解析を行った。その結果、投与直後は肺、肝、腎、脾臓とも血管内に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。誘導結合プラズマ法では、投与1時間後から投与後3日目まで胆汁中に銀元素を認めた。尿中には計測を通して銀元素は検出されなかった。

新たなMRI造影剤として、Stöber法によりシリカ-ガドリニウム-シリカの3層構造のナノ粒子の作製を試み、MRIによる造影効果を確認したところ、シリカ-ガ

ドリニウムナノ粒子に比べて高い造影効果があることがわかった (図)。さらに、シリカコーティングした金コロイドを用い、X線による造影効果を確認するとともに、細胞毒性試験を行った。ガドリニウム内包シリカコーティングビーズをMRIで撮像した結果、水およびシリカ-ガドリニウムナノ粒子と比較して高い造影効果を確認できた。

amine-freeシリカコーティング法として、過塩素酸銀(AgClO_4)水溶液をヨウ化カルシウム(KI)水溶液に添加し、AgIコロイド溶液を調製した。これにシランカップリング剤である(3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane (MPS)を加え、その15分後にエタノール、Tetraethoxy silane (TEOS)、NaOHを順に加えることでAgI/SiO₂複合粒子を作製した。[AgI]= 1.0×10^{-3} mol/lとした。その結果、TEOS濃度を4.0 mmol/l以上にするとAgI粒子はシリカによって良好にコーティングされるようになった。またシリカコーティング粒子の平均粒径および分散度はそれぞれ28.3 nmおよび20.8 %、31.6 nmおよび16.6 %であり、従来よりも小粒径のAgI/SiO₂複合粒子を合成することができた。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察 (多田、権田) : あるサイズのナノ粒子は腫瘍血管を透過して、腫瘍組織に蓄積されることがわかっているが、腫瘍血管から漏出したナノ粒子は腫瘍間質に出て更に間質内の流れに応じてそれぞれ運動することとなる。その際、ナノ粒子は粒径に応じて挙動が異

なることが予測されるため、本年度は20nm、40nm、100nmのナノ粒子の腫瘍間質における動態を1粒子レベルで計測した。

挙動はランダムな運動と方向性を持った運動が組み合わさったものであり、解析によって拡散と間質内の体液の流れによるものであることが判明した。また、粒径の増大につれて拡散の低下が認められたが、間質内の体液の流れによる運動は粒径には依存せず、腫瘍内の場所に大きく依存していた。得られた結果からシミュレーションを行った結果、血管外漏出から腫瘍へ至るまでの時間を算出し得た。

腫瘍組織内の蛍光マーカーでラベルした腫瘍細胞は腫瘍血管から遠い場所ではゆっくりとした拡散性を示したが、腫瘍血管近くでは高い拡散性と糸状仮足の形成を認めた。

3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立(武田、小林正樹、甘利、亀井、仲田ら)：

これまで超音波タグ蛍光イメージング装置によりアガロース生体模擬試料を用いて画像計測に成功したが、本年はより生体に近い計測対象として食用肉に包埋した蛍光色素の計測を試みた。測定結果を図に示す。画像中央部に蛍光強度が高い部位が局在していることがわかる。実際、測定後に試料を切断して内部を観察したところ、設計通りの位置に蛍光体が埋設されていることを確認した。また図3は図2の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、X方向走査範囲のほぼ中央に蛍光体サイズ程度の分

解能でピーク位置が検出されていることがわかる。

D 考察

機能性ナノ粒子を利用した DDS において動態に関与する大きな要素は粒径とゼータ電位である。特に腫瘍組織における DDS に粒径は重要であり、サイズ効果によってナノ粒子が選択的に取り込まれることが指摘されている。従ってナノ粒子の腫瘍への集積後の腫瘍内の動態に与える粒径の影響を把握することは極めて重要である。EPR (extended permeability and retention)効果によって腫瘍組織に到達し得るサイズを予備的に検討した結果、200nm のナノ粒子は腫瘍血管を通過せず、20nm、40nm、100nm は通過できたため、本年度は 20nm、40nm、100nm の各粒径についてそれぞれ詳細にその動態を計測し、解析した。これまでの研究で生体内におけるトラスツズマブ結合量子ドットの単分子イメージングに世界で初めて成功しており、本手法は今後、生体内の薬物動態や信号伝達の研究を大きく進歩させるものになると考えられる。

新たな X 線 CT などの造影剤として開発したナノサイズヨウ化銀ビーズの体内動態の検討を行い、胆汁中に銀を検出することにより、排泄経路を特定することができた。臨床応用を目指すナノ粒子の実用化にあたり、安全投与量の決定ならびに体内動態、排泄経路の解明は必ず必要となる。多くのナノ粒子が有用性のみ強調される一方で、体内動態・排泄経路が明確に示されていない現状を考えると本研究はその点でも極めて意義深いもので

ある。現在まだサンプル数が少ないため今後更に解析を進め、排泄経路を確定したい。

以下各項目について述べる。

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRI ナノマーカの開発 (小林芳男、名嘉、川添、水関、粕谷、武田、甘利、亀井)

ポルフィリン誘導体のシミュレーション実験の結果から、最も安定な異性体はC-C結合構造を有するものであることが明らかになった。エステル結合構造からエーテル結合構造への構造変化は熱力学的に可能であると期待された。一重項-三重項のエネルギーギャップから全てのダイマー異性体はPDTの光学活性を示すことが分かった。これにより、沢山の候補材料の合成と検討の手間を省くことができ、より早く最も有望な材料の具体的な実験に着手することができる。本手法は物質選別の時間的、費用的コストを大きく削減させ得る技術といえる。

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、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、その体内動態を示してきた。今回初めて誘導結合プラズマ法で各臓器、胆汁ならびに尿中の銀元素を計測した。胆汁中に銀を検出、尿中に銀が計測されなかったことからシリカコーティングヨウ化銀ビーズは胆汁排泄されることが強く示唆された。また、シリカコーティングヨウ化銀ビーズは従来の造影剤に比べ造影効果が2-3日と長期にわたって持続し、1週間以内に完全に排泄されることがわか

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、例えば手術や放射線治療において治療前後に持続した造影効果が必要な際に有用であり、新たな用途が期待される。がんの場合EPR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ことから、抗体など特別な結合分子を用いずとも長時間の造影効果が得られるものと考えられる。

ラット、ウサギを用いた血管内投与では血管内に凝集等も起こらず、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。現在の問題として、従来のX線造影剤に比べて造影効果がやや不足であることが挙げられる。

昨年度の課題であった高濃度化については、粒径500nmのヨウ化銀ビーズについては従来の3倍程度の濃度にまで改良されており今後、更に小さい粒径のシリカコーティングヨウ化銀ビーズの高濃度化に取り組みたい。またamin-freeシリカカプセル化法は有害な薬剤を使用しない点で安全性の確保に大きく寄与すると考えられる。さらに静脈投与時の安全性の確保を中心に臨床応用を目指したい。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察 (多田、権田、河合)

異なる粒径の蛍光ナノ粒子の腫瘍間質における動態を詳細に計測することができた。20nmのナノ粒子は腫瘍血管付近から間質、細胞間までリンパ流の影響を強

く受け、これとは対照的に粒径100nmの粒子は腫瘍血管付近でこそリンパ流の影響を受けるものの、腫瘍間質や腫瘍細胞間ではほとんど拡散運動のみであることが明らかになった。今回の知見はがん治療におけるDDSを考える上で極めて重要である。つまり今回のモデルにおいてEPR効果によりナノ粒子を腫瘍血管から漏出させるには100nmかそれ以下であることが必要で、腫瘍間質から速やかに移動させ、腫瘍から流し去る、または腫瘍細胞に到達させるには粒径20nmかそれ以下の小さなナノ粒子がよく、間質に長時間とどめておくには40nm以上の大きな粒子がよいことになる。このように間質における動態を詳細に検討した研究は過去になく、新たなナノ粒子のDDS検討に極めて有用な手法といえる。我々はこれまでにトラスツズマブがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、核内に移行するまでの一連の過程を観測しており、トラスツズマブがどのような経路を辿って核に至るのかを明確に知ることができた。今後は本研究で開発した装置を使って、以上のようなDDSに関する研究に加え、多重蛍光染色も用いて、トラスツズマブの薬効メカニズムの詳細や、薬剤耐性のメカニズムをリアルタイムイメージングの利点を生かして解明していくことを目指す。また、装置の高速化・位置高精度化、分解能向上を図り、トラスツズマブの細胞内動態をさらに詳細にイメージングすること、装置を担がんマウスの腫瘍細胞イメージングへ応用すること等を試みる予定である。

本研究によって今回初めて腫瘍組織内

の腫瘍細胞の動態をin vivoで観察することができた。さらに腫瘍細胞の血管内移動を細胞レベルでin vivo イメージングできた意義は大きく、今後、腫瘍細胞の血管外進出、定着、増殖等を詳細に解析して転移のメカニズムを解明し、観察精度をさらに発展させて最終的にはがん転移巣に対する抗がん剤の効果を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。

3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立 (武田、小林正樹、甘利、亀井、桜井、仲田)

従来の蛍光計測法の計測限界である1cm以上の深さの蛍光色素の検出に成功したため、現在、超音波素子のアレイ化など実用化に向けた装置の改良を行っている。これに平行して生体に安全に使用しうる蛍光プローブの開発に取り組んでいる。本年度は蛍光ポリスチレンビーズのシリカコーティング化に取り組み、この粒子を用いてラット鼠径リンパ節を体表から検出することに成功した。本方法は生体における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蛍光粒子として期待できる。蛍光検出率は従来のものと変わらないが、粒径の均一化など今後更に改良を重ね、現在進行中のシリカコーティングヨウ化銀ビーズとともに安全性を確認し、生体で使用し得る蛍光粒子として実用化に向けた検討を

重ねて行きたい。さらに、高感度な蛍光計測を生体に应用するためには量子ドットが最も好ましいと考えられるが、その多くは脾臓に非特異的に取り込まれ、効率的な計測ができない。生体内の量子ドットの非特異的結合を効率的に抑制し、かつ安全性を確保し得るコーティングとしてシリカによるコーティングを早急に開発したい。また、金ナノ粒子の造影剤の開発も試みており、安全性を確認しつつ、X線造影剤としての応用を検討している。

E 結論

本研究の結果、生体内においてナノ粒子 1 粒子レベルで蛍光計測する技術を用い、初めて粒子の大きさによる挙動の違いを示すことができた。この手法は今後、癌の細胞レベルでの診断や、薬物動態、シグナル伝達の解明など臨床に直結する基礎研究への応用が期待される。また、蛍光計測を従来に比べて深部まで観察し得る技術は蛍光計測法を病巣検出、センチネルリンパ節検出等、医療応用する上で画期的な技術と言える。計測技術と平行して蛍光粒子の開発も行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) 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*, 2007; 67: 1138-1144.

2) Lima R, Wada S, Takeda M, Tsubota K, Yamaguchi T, in vitro confocal micro-PIV measurements of blood flow in a square microchannel: The effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles. *Journal of Biomechanics*, 40, 2752-2757, 2007

3) Kobayashi Y, Imai J, Ngao D, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M, Preparation of multilayered silica-Gd-silica core-shell particles and their magnetic resonance images. *Colloids and Surfaces A*, 308 (1), 14-19, 2007

4) Kobayashi Y, Misawa K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M, Control of Shell Thickness in Silica-Coating of AgI Nanoparticles. *Advanced Materials Research* 29-30, 191-194, 2007

5) Park YS, Kasuya A, Dmytruk A, Yasuto N, Takeda M, Ohuchi N, Sato Y, Tohji, K Uo M, Watari F. Concentrated colloids of silica-encapsulated gold nanoparticles: colloidal stability, cytotoxicity, and X-ray absorption. *J. Nanosci. Nanotech.* 7 (8), 2690-2695, 2007.

6) Park YS, Dmytruk A, Dmitruk I, Noda Y, Kasuya A, Takeda M, Ohuchi N.

- Aqueous-phase synthesis of ultra-stable small CdSe nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotech.* 7 (11), 3750-3753 2007
- 7) Zhou X, Shao Z, Kobayashi Y, Wang X, Ohuchi N, Takeda M, Kasuya A, Photoluminescence of CdSe and CdSe/CdO·nH₂O Core/Shell Nanoparticles Prepared in Aqueous Solution. *Optical Materials*, 29, 1048-1054, 2007
- 8) Ishida T, Takeda M, Suzuki A, Amari M, Ohuchi N, Significance of irradiation in breast conserving treatment: comparison of local recurrence rates in irradiated and nonirradiated groups. *Int J Clin Oncol*, 13, 12-17, 2008
- 9) Takeda M, Tada H, Higuchi H, Kobayashi Y, Kobayashi M, Sakurai Y, Ishida T, Ohuchi N, In vivo single molecular imaging and sentinel node navigation by nano-technology for molecular targeting drug delivery system and tailor made medicine. *Breast cancer*, in press.
- 10) 樋口秀男、大内憲明、単一量子ドットのバイオ・医療ナノイメージング、宇理須恒雄編、ナノメディシン ナノテクノ医療応用、52-63、2008年2月
- 11) 武田元博、小林芳男、小林正樹、桜井遊、甘利正和、石田孝宣、鈴木昭彦、大内憲明、機能性ナノ粒子による生体イメージングがん診療への応用一、宇理須恒雄編、ナノメディシン ナノテクノ医療応用、64-74、2008年2月
2. 学会発表
(国際会議)
- 1) 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Takeda M, Tada H, Kawai M, Sakurai Y, Higuchi H, Ohuchi N, In vivo Single Molecular Imaging and Sentinel Node Navigation using Nano-biotechnology for Medical Application. The 3rd Tohoku-NUS Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region, 10-11 Dec 2007, National University of Singapore
- 4) Kawai M, Takeda M, Higuchi H, Ohuchi N, Tumor Interstitial

- Nano-particle Delivery and Analysis in the Human Tumor Xenograft in Mice. The 3rd Tohoku-NUS Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region, 10-11 Dec 2007, National University of Singapore
- 5) Hamanaka Y, Takeda M, Tada H, Kawai M, Sakurai Y, Amari M, Suzuki A, Ishida T, Ohuchi N, In vivo tracking of anti-cancer drugs and the active sites conjugated with quantum dots. The 3rd Tohoku-NUS Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region, 10-11 Dec 2007, National University of Singapore
 - 6) Sakurai Y, Takeda M, Cong L, Amari M, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei T, Ohuchi N, In vivo Distribution of Silver Iodide Beads in Cancerous Legions. The 3rd Tohoku-NUS Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region, 10-11 Dec 2007, National University of Singapore
 - 7) Kawai, M., Higuchi, H., Gonda, K., Takeda, M., and Ohuchi, N. In vivo imaging of vascular permeability using nano-objects in mice tumor. 2nd "Hot Topics in Molecular Imaging - TOPIM" meeting of the European Society for Molecular Imaging. February 2008 Grenoble, France.
 - 8) Ohuchi, N., Takeda, M., Kawai, M., Tada, H. Sakurai, Y., Gonda, K., and Higuchi, H. Novel imaging techniques with functional nano-objects for cancer diagnosis. 2nd "Hot Topics in Molecular Imaging - TOPIM" meeting of the European Society for Molecular Imaging, February 2008 Grenoble, France.
 - 9) Ohuchi N, Tada H, Sakurai Y, Kawai M, Takeda and Higuchi H, Cancer research based on nano-bio technology: Nano-DDS and molecular imaging of single particle *in vivo*. 1st International Symposium on Nanomedicine-from basic to Applications- (ISNM2007), April 2007, Okazaki
 - 10) Y. Kobayashi, N. Shimizu, M. Takeda, N. Ohuchi, A. Kasuya, M. Konno, Preparation of Amine-Free Silica-Coated AgI Nanoparticles with a Modified Stöber Method, The 9th Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society (YUCOMAT 2007), 2007, Herceg Novi, Montenegro
- (国内会議)
- 1) 武田元博、樋口秀男、大内憲明、機能性ナノ粒子の医学領域における展開。異分野融合ナノテクノロジー横浜コロキウム、平成20年2月1日、横浜
 - 2) 武田元博、桜井遊、小林芳男、叢莉蔓、甘利正和、亀井尚、石田孝宣、鈴木昭

- 彦、菅原旭浩、大内憲明、ナノサイズ
 ヨウ化銀ビーズの腫瘍とセンチネル
 リンパ節のX線CT造影効果。第17回
 乳癌基礎研究会、平成19年7月28-29
 日、大阪
- 3) Motohiro Takeda, Hideo Higuchi &
 Noriaki Ohuchi, Nano-imaging of
 single quantum dots and
 nano-particles in mice tumor. 第
 66回日本癌学会学術総会、2007年10
 月、横浜
- 4) Kawai M, Higuchi H, Takeda M, N O.
 In Vivo Imaging of Vascular
 Permeability Using Nanocrystals in
 Mice Tumor. 第66回日本癌学会学術
 総会、2007年10月、横浜.
- 5) 河合賢朗, 樋口秀男, 大内憲明. マ
 ウス腫瘍新生血管における透過性の
 In vivo imaging. ナノ学会第5回大
 会、2007年5月、つくば市.
- 6) 甘利 正和、石田 孝宣、武田 元博、
 鈴木 昭彦、宇佐見 伸、多田 寛、
 大内 憲明、進行・再発乳癌における
 カペシタビンの治療効果の検討。第
 107回日本外科学会総会、2007年4月、
 大阪
- 7) 甘利正和、石田孝宣、武田元博、鈴木
 昭彦、大内憲明、若年者乳癌の臨床病
 理学的検討。第15回日本乳癌学会学
 術総会、2007年6月、横浜
- 8) 大内憲明, 多田寛, , 河合賢朗, 武田
 元博, 石田孝宣, 樋口秀男, . 生体超
 微細1分子可視化によるナノ DDS と
 乳癌標的治療. 第15回日本乳癌学
 会総会、2007年6月、横浜
- 9) 武田元博、樋口秀男、小林正樹、小林
 芳男、大内憲明、機能性ナノ粒子によ
 るナノからマクロレベルの生体イメ
 ージング。2008年春季第55回応用物
 理学関係連合講演会、2008年3月
 27-30日、船橋市
- 10) 湊真理絵、小林芳男、液相法による
 AgI/SiO₂ 複合粒子の作製法の開発の
 研究。第18回日本化学会関東支部茨
 城地区研究交流会 平成19年11月
- 11) 湊真理絵、小林芳男、武田元博、粕谷
 厚生、大内憲明、AgI/SiO₂ 複合粒子コ
 ロイドの調製法の開発。化学工学会第
 73年会 平成20年3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

II. 分担研究報告

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 桜井 遊 東北大学医学系研究科

(分担) 研究者 河合 賢朗 東北大学医学系研究科

(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って革新的な医療を実現すべく、新規開発したナノ材料・高感度計測装置を用いた生体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：シリカコーティング金粒子の作製に成功した。また、本研究で先に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を検討し、胆汁排泄を示唆する結果を得た。また蛍光ナノビーズにおいてもシリカコーティングに成功し、従来のセンチネルリンパ節生検法との比較を行い、その有用性を示した。更に3重構造のシリカコーティングガドリニウムビーズの作製に成功した。
- ②. 生体における腫瘍マッピング技術：(i) 高効率 X線・MRI 造影ナノ粒子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等の結合物の最適なコーティング材料の検討を行った。その結果、シリカコーティング粒子の体内動態が明らかになりつつあり、完全排泄される可能性が高いことから今後はシリカコーティングを中心に検討を進めることとした。シリカコーティングヨウ化銀ビーズ表面のカルボキシル基、アミノ基修飾に成功したため、現在抗体結合物を作製し、腫瘍親和性並びに体内動態の検討を進めている。(ii) 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実体顕微鏡一体型装置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つを備える新規顕微鏡を試作することとした。
- ③. ナノ粒子によるDDSの可能性を探索する研究：腫瘍間質におけるナノ粒子の動態を粒子径20nm, 40nm, 100nm毎に検討し、それぞれの間質のリンパ流と拡散の影響の相違を初めて明らかにした。

A 研究目的

現在がん診療において薬物療法や放射線療法といった治療法が発達し、多くの診療科が力を合わせて複数の治療法を組み合わせて行う、いわゆる集学的治療が

主流となった。その中で化学療法並びに外科的切除は極めて有力な治療法である。外科的切除として、臓器の機能を温存し、手術による障害を軽減するため、腫瘍周辺の最小限の正常組織を含めた腫瘍切除

(部分切除) すなわち臓器温存手術が近年様々な臓器に対して行われている。悪性腫瘍に対する外科治療の基本は完全な切除であり、従来の悪性腫瘍切除術は安全マージンとして腫瘍病巣に加え、ある程度の正常組織を含めた切除を行い、完全な腫瘍摘出を目指す。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、後に病理診断で断端陽性と判断することがしばしば起こりうる。このように肉眼・触診による切除範囲決定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。しかし現状では病理医は一部の大病院にのみ局在し、すべての病院で迅速病理診断が可能なのわけではない。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計測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。生体の蛍光計測を行うにあたって病巣は必ずしも体表面に存在するわけではないので、より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。さらにCTやMRIといった方法でも長期にわたって造影効果が持続する造影剤があれば腫瘍の可視

化と治療への利用に非常に有用である。また一方で、抗がん剤を腫瘍に効率的に到達させることで抗腫瘍効果を高める必要性が指摘され、いまやドラッグデリバリーシステム(DDS)は薬効を得るための重要な研究分野であると認識されている。薬物動態を確実に知るためには従来のマクロレベルの全体量を測る計測ではなく、1分子レベルの計測が最も確実であり、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、がんのナノ粒子DDSのin vivoにおけるナノからマクロレベルの新規計測を行い、新たな診断・治療法の開発、医療応用を目的とする。

また、近年、特殊な構造・機能を持つナノ粒子が数多く作製され、様々な分野で応用が試みられている。特に医学薬学分野では、これまで不可能であった医療の実現が期待される。しかし多くのナノ粒子は、安全性が確立されておらず、体内動態も明らかにされていないのが実状である。ゆえに、本研究において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、センチネルリンパ節および、がん病変の可視化による新たな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、体内動態を明確にする。ま

たそれに平行して、蛍光計測により病巣を可視化する上で不可欠な、深部に存在す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）、ナノ粒子DDSグループ（河合、権田、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（武田、亀井、桜井、甘利、小林芳、仲田）：ラットに対し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。更に電子顕微鏡で局在が確認された臓器については誘導結合プラズマ法により銀元素の定量計測を行った。

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核とした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。昨年度作製したシリカ-ガドリニウムナノ粒子についてはガドリニウム層が表面に露出し、生体への危険性が懸念されたため、更に表層へのシリカコーティングを試みた。

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）：腫瘍を微細なレベルまで可視化する技術には、生体に対し安全なマーカーと計測技術の2つが必要である。腫瘍のマーキング

には蛍光計測法が有力な方法のひとつである。しかしながら従来動物実験に使用されていた蛍光ナノ粒子は安全性確保のためのコーティングがなされておらず、医療応用にはコーティングが必要である。今回径20nmのポリスチレン蛍光ビーズのシリカコーティングを行い、ラットをモデルとしたセンチネルリンパ節検出を試み、コーティング蛍光ビーズの生体計測の有用性について検討した。

3. ナノ粒子によるDDSの可能性を探索する研究（河合、権田、武田）：ナノ粒子の腫瘍における動態を解明すべく、担がんマウスをモデルとして、20nm、40nmおよび100nmの蛍光ナノ粒子を静脈投与した後、蛍光1粒子イメージング装置を用いてそれぞれの粒子の挙動を1粒子レベルで計測しその特徴を解析した。

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、経時的にX線CTで撮像して造影効果の持続を確認した後、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、一部の個体は誘導結合プラズマ法で銀の元素定量を行った。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、それ以外の臓器ではヨウ化銀ビーズを認めなかった。誘導結合プラズマ法については、投与後24時間までは脾臓と肝臓に銀が検出されたが、1週間後にはまったく検出されなくなった。また腎臓においてはシリカコーティングヨウ化銀ビーズが血流中に存在する時間以外には銀はほとんど検出されず、以上により体外への完全排泄が示唆された (2nd “Hot Topics in Molecular Imaging - TOPIIM” meeting of the European Society for Molecular Imaging)。

新たなMRI造影剤として、ガドリニウムナノ粒子を作製した。ガドリニウムはそれ自体コロイドを形成し難いため、最初にStöber法によりシリカナノ粒子を作製し、ガドリニウムコーティングを施した後、更にシリカコーティングし、3重粒子とすることで初めて作製に成功した (Colloids and Surfaces A, 2007)。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、水および昨年度に作製したシリカガドリニウムナノ粒子と比較して高い造影効果を示すことが確認できた。今回作製したシリカコーティング金コロイド粒子は、X線CTにて水と比較して増強効果を認め、培養細胞を用いた毒性試験を行った (*J. Nanosci. Nanotech.*, 2007)。

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) :

1) 鏡視下手術における蛍光検出法の開発 ; 鏡視下手術は低侵襲な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、様々な悪性腫瘍手術へ応用され始めている。我々はこれまでセンチネルリンパ節生検における蛍光計測法の応用を提唱し、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。従来から行われる色素法との比較で、量子ドットは色素法をやや上回る検出率を示した。超音波蛍光断層撮影装置と組み合わせた実用化が期待される。また、シリカコーティングヨウ化銀ビーズによる腫瘍の造影に初めて成功した (第66回日本癌学会学術総会、2007年)。

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点での深部限界である、1cmを超える必要がある。我々は小林正らと共に生体と同程度の光散乱特性を持つ模擬生体を用いた計測を行い、3cm程度の深部蛍光色素の計測に成功した。さらに本年度は市販の食用肉を用いて同様の結果が得られることを確認している。現在、動物をモデルとした計測を行うための装置の改良を更に進めている。

3. ナノ粒子によるDDSの可能性を探

索する研究(河合、権田、武田)：20nm、40nm および 100nm の蛍光ナノ粒子をそれぞれ静脈投与した後、dorsal skin fold chamber 法により露出した腫瘍を、蛍光1粒子イメージング装置を用いて、腫瘍血管付近、腫瘍間質、腫瘍細胞間について、それぞれの粒子の動きを観察した。その結果、20nm の粒子は腫瘍血管付近、腫瘍間質、腫瘍細胞間のそれぞれの場所でリンパ流の影響を強く受け、一定の方向に移動するのに対し、100nm の粒子は特に腫瘍間質、腫瘍細胞間でリンパ流の影響をほとんど受けず、拡散運動を行うことが明らかになった(2nd “Hot Topics in Molecular Imaging - TOPIM” meeting of the European Society for Molecular Imaging)。

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あたって、ブレイクスルーとなる新しい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、安全投与量のうち、体内動態、排泄経路について誘導結合プラズマ法による定量を含め重点的に研究を行った。

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)：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これまで示してきたが、今回

初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、銀の定量計測で検出し得た。その結果、臓器としては肝臓並びに脾臓に蓄積し、腎臓には蓄積しないことがわかった。さらに従来の造影剤に比べ長期の造影効果を有することがわかった。即ち造影効果は24時間以降も持続し、1週間以内に排泄されることが明らかになった。誘導結合プラズマ法による定量計測では胆汁中に銀が検出され、尿中には銀が検出されなかった。この結果から、シリカコーティングヨウ化銀ビーズの胆汁排泄が示唆される。従来のナノ粒子は体内動態、排泄経路の明確でないものが多いが、シリカコーティングナノ粒子については体内動態、排泄経路の重要な部分が解明されつつある。この結果は今後ナノ粒子の臨床応用、またその用途を決める上で大きな進歩と言える。更に、血管内では凝集等も起こらず、短期観察ではあるが血栓形成等の重大な障害も認められなかった。

以上によりシリカコーティングヨウ化銀ビーズは病変の造影効果を長時間維持したい場合に有用であり、外科手術や放射線治療など、治療において病変の領域を視覚化する際に実に有望な新規マーカーである。また、がんの場合EPR (extended permeability and retention)効果があるため、さらに長時間にわたって腫瘍に蓄積し、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。現在ヨウ化銀の濃度を上げる作成法に取り組んでおり、粒