

径の大きなシリカコーティングヨウ化銀ビーズについては高濃度化に成功した。今後更に粒径の小さなシリカコーティングヨウ化銀ビーズの高濃度化を行う予定である。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・動態が詳細に示された意義は大きい。

更に、MRIの造影剤として、ガドリニウムナノ粒子の3重ナノ粒子の作製に初めて成功した。この3重ナノ粒子はガドリニウムが露出したガドリニウムナノ粒子より高い造影効果が得られることがわかった。シリカコーティング金コロイドは培養細胞についての安全性は確認したが、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線造影剤として動物をモデルとした有用性、安全性について検討を行う予定である。

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、内視鏡を用いて胃の所属リンパ節の検出実験を行なった結果、色素法に比べてやや優れた検出率を示すことが初めて明らかにされた。本方法で肉眼による色素法ではわかりにくいリンパ節も蛍光検出できることが明らかになったことから、センチネルリンパ節生検に有用なだけでなく、蛍光色素でマーキングした腫瘍病変の検出・外科手術への応用も可能と考えられ、腫瘍を完全に切除し得る精密な外科手術法の確立に大きく貢献しうる技術と言える。現在の検出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ていく。

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)：今回初めてナノ粒子の腫瘍における運動はその粒径によって大きく異なることが詳細に示された。この知見は、機能性ナノ粒子のDDSを考える上で極めて有用であり、例えば、早く腫瘍細胞に到達させたい場合は粒径の小さな粒子、間質に長くとどめたい場合には粒径の比較的大きな粒子を選択することで目的とするDDSが選択可能なことを示している。

## E 結論

本研究により、ヨウ化銀ビーズの詳細な体内動態、排泄経路を初めて明らかにした。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、内視鏡観察技術の開発は、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。ナノ粒子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) 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
  - 2) 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
  - 3) 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
  - 4) 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.
  - 5) 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
  - 6) Zhou X, Shao Z, Kobayashi Y, Wang X, Ohuchi N, Takeda M, Kasuya A, Photoluminescence of CdSe and CdSe/CdO·nH<sub>2</sub>O Core/Shell Nanoparticles Prepared in Aqueous Solution. *Optical Materials*, 29, 1048-1054, 2007
  - 7) 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.
  - 8) 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—、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) 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 9<sup>th</sup> 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 9<sup>th</sup>

- 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 3<sup>rd</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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.
- (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

## 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

(分担) 研究者 水関 博志 東北大学金属材料研究所

#### 研究要旨

我々は 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見出し、さらに PDT 活性を生み出すダイマーおよびオリゴマー構造を探索した。本研究プロジェクトでは、ヘマトポルフィリン誘導体をナノ粒子の機能付与分子の有力な候補と考えている。そのため、次年度以降は多数あるヘマトポルフィリン誘導体の内、有用な構造を TDDFT 計算によって導き出し、薬剤選定に役立てる予定である。

#### A. 研究目的

いまだ研究段階にあるが、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いる。実験結果からはヘマトポルフィリンの結合形式は複数あり、相互に変換可能であることが明らかになり、その構造の決定が急がれている。我々は 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見出し、さらに PDT 活性を生み出すダイマーおよびオリゴマー構造を探索することを目的とする。

#### B. 研究方法 (計算方法)

予備的な計算として異なる汎関数を用いてヘマトポルフィリンモノマーの最適化を行い、類似のポルフィリン単結晶の実験値と比較することにより、このような系では PBEPBE が実験結果を再現するより良い汎関数であることを確認した。本研究ではこの PBEPBE 汎関数を用いてヘマトポルフィリンのモノマー、ダイマーを系統的に計算した。また基底関数として diffuse 関数を含む 6-31G(d) を使った。計算機は東北大学・金属材料研究所・計

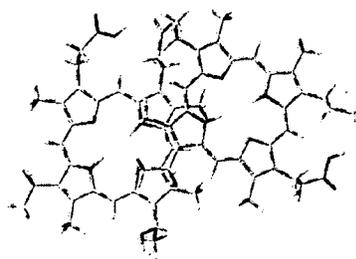
算材料学センターのスーパーコンピューティングシステムを、計算プログラムとしては非経験的分子軌道計算プログラム Gaussian03 を用いた。

(倫理面への配慮)

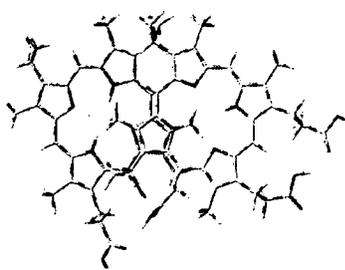
該当なし

### C. 研究結果

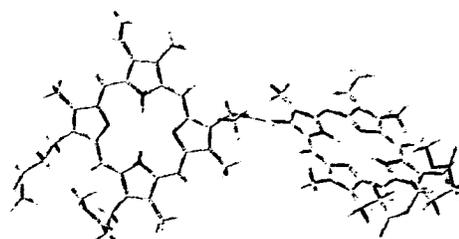
ヘマトポルフィリンのダイマーは3つの異なる化学結合(C-C結合、エーテル結合、エステル結合)の可能性があることが知られている。



Ester Linked



Ether Linked



C-C Linked

Figure 1. Three types of linkages

それらの異性体の最適化後のシングレット基底状態の構造を Figure 1 に示す。異なる初期配座異性体を持つこれらの構造を最適化すると Figure 1 に示すような結果になった。

われわれの計算からトータルエネルギーはC-C結合構造 < エーテル結合構造 < エステル結合構造の順であることを明らかにした。エーテル結合構造はエステル結合構造の分子よりも18Kcal/mol安定であり、その反応に要するエネルギーは-19.5Kcal/molであった。この結果はエーテル結合構造とC-C結合構造が光力学活性をもつ構成物と推測される実験結果と一致している。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構造と電子状態から明らかになった。エステル結合構造とエーテル結合構造の異性体同士の自由エネルギー差は実験で得られている観測結果と熱力学的に一致している。エーテル結合とエステル結合のダイマーは2つのポルフィリンリング間の相互作用により安定化している。一方、C-C結合のダイマーは線形の形状をしている。これらの異性体のバンドギャ

Table 1: Comparison TDDFT and Uv-vis spectral data

Compounds	Soret band	Q – Band (nm)			
Monomer	396.8 (396.0)	505.6 (505.0)	537.6 617.6 (537.0)	566.4 (567.0)	(617.0)
Ether linked dimer	398.0 (398.0)	505.6 (503.0)	534.4 624.4 (535.0)	570.4 (570.0)	(624.0)
Ester linked dimer	400.0	504.0	532.0 620.0	568.0	
C-C linked dimer	398.0	504.0	532.0 622.0	568.0	

- Values given in bracket are Uv-vis spectral data

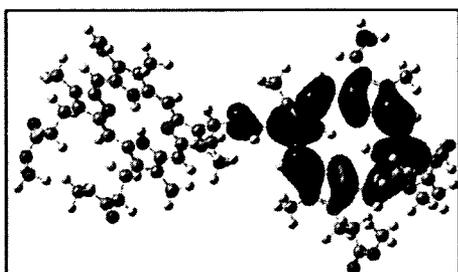
ップはエーテル結合構造が一番大きく 2.829eV であり、C-C 結合構造とエステル結合構造はそれぞれ 2.775eV と 2.693eV であった。この結果よりエーテル結合構造や C-C 結合構造に比べて、エステル結合構造は容易に励起することが分かった。

TDDFT 計算による振動解析結果は Table 1 に示すように紫外・可視吸収スペクトル (Uv-vis スペクトル) データと良い一致を示している。

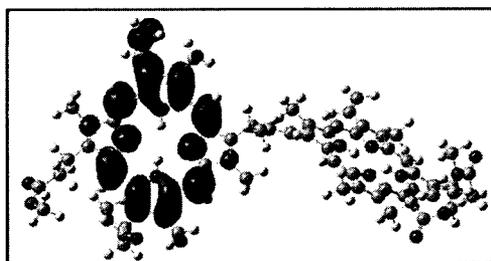
これらのスペクトルは、主要な励起は (HOMO, HOMO-1, LUMO, LUMO+1) (HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital 最高被占軌道, LUMO: Lowest Unoccupied Molecular

Orbital 最低空軌道) を含むという Gouterman の 4 軌道モデルにより解析した。C-C 結合の異性体構造の HOMO-LUMO ダイアグラムは、1つのポルフィリンリングに局在した HOMO の電子密度を示している。一方、Figure 2 に示すように LUMO は片方のポルフィリンリングに局在している。そのため、これらの遷移は HOMO-LUMO 軌道間の容易な電子移動が可能である。PDF の光感受性物質として機能する異性体の可能性を探るために、これら 3 種類のダイマーの一重項-三重項エネルギーギャップを求め、その値が実験より最適な値であると分かっている

0.98eV より大きい値なのかを確認した。すなわち、三重項-一重項エネルギー変化が0.98eVのときに酸素の励起が行われるためである。計算結果はエーテル結合構造では1.54eV、C-C結合構造とエステル結合構造ではそれぞれ1.53eV、1.57eVであった。これより、これら3種類の異性体は一重項酸素を生み出す光線感作物質として機能することが明らかになった。



HOMO



LUMO

Figure 2. HOMO- LUMO diagram of C-C linked isomer

さらに、三量体、四量体、五量体、六量体の構造最適化を行った。それらの計算結果からポルフィリン同士の接続方法により、ポルフィリンリングの構造への影響が異なることが明らかになった。

今回、より大きなオリゴマーの計算を行ったエーテル結合構造とC-C接合構造の分子系ではポルフィリンリングの3次元構造

を形成することが分かった。

#### D. 考察

ヘマトポルフィリン二量体の系統的な計算を行い、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ことが期待された。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。エーテル結合構造とC-C結合構造を持つより大きなオリゴマーでは3次元構造になることが明らかになった。

#### E. 結論および今後の研究計画

今後はヘマトポルフィリンのより大きなオリゴマーに関して様々な配座異性体を研究し、安定性と構造の関係を明らかにし、TDDFT計算によりスペクトル測定の実験結果をサポートする計画である。本研究プロジェクトでは、ヘマトポルフィリン誘導体をナノ粒子の有力な機能付与分子の有力な候補と考えている。そのため将来の課題として、蛍光・X線・MRIマーカー表面に生体親和性（水中完全分散・生体無毒性）と細胞内組織ターゲット指向の機能を付加させる表面化学修飾を行い、タンパク質や光線力学治療薬（照射でがん細胞を破壊する薬剤のこと）が結合できるよう改良する研究を行う予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

TD-DFT studies of hematoporphyrin and

its dimers (to be submitted in Material Trans.)

## 2. 学会発表

A. Suvitha, R. V. Belosludov, H. Mizuseki, Y. Kawazoe and M. Kohno  
TD-DFT studies on Oligomers of Hematoporphyrin in ACCMS-VO held during January 26-29th in Institute for Materials Research, Tohoku University, Sendai.

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 東北大学先進医工学研究機構 助教

研究要旨

がんの最も脅威な点の1つは転移能である。転移性がん細胞は膜伸縮運動(仮足形成)によって原発巣から血管に向かって運動し、血流に乗り他の組織へ転移する。これまで、がん転移を細胞レベルで解析する研究は、技術的な困難さから培養皿(*in vitro*)で主に行われてきた。しかし細胞や血管が複雑に位置・配行する腫瘍(*in vivo*)は *in vitro* と大きく異なるため、がん細胞運動や抗がん剤効果を本質的に理解し治療に役立てるには、腫瘍内の細胞動態を可視化する技術(*in vivo* イメージング)が必要となる本研究では、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、ナノメートル、ミリ秒スケールで生きた腫瘍の細胞膜の動態を観察することを試みた。その結果、腫瘍組織内の存在場所に依存して細胞膜の動態が大きく異なることをナノメートル、ミリ秒スケールで解析することに成功した。

A. 研究目的

生きた腫瘍の細胞膜の動態をナノメートル、ミリ秒スケールで *in vivo* イメージングし、がん転移に関わる膜動態のメカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

低浸潤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。次に細胞膜をラベルするプローブを作製するために、高輝度で長時間退色しな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) PAR1 発現 KPL-4

細胞をラベルし *in vitro* で観察を行うこと、(2) PAR1 発現 KPL-4 細胞を用いてヌードマウスに腫瘍を調製し、マウス尾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* 観察を行うことを試みた。また、観察の際は、仮足形成が活発な膜伸縮領域と非伸縮領域に分けてイメージングを行った(イメージング装置は以下に示す)。

【イメージング装置】 IX71 落射照明顕微鏡(オリンパス)に、532nm レーザー、横河社製共焦点ユニット、EM-CCD カメラ(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 *in vivo* イメージング装置を

開発した。イメージング画像は、共同研究者の渡邊 (JST さきがけ研究員) 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、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. 研究結果と考察

*in vitro*の細胞を細胞挙動に影響の無いプローブ濃度 (5nM) で標識し、膜蛋白質動態を解析した結果、「膜の非伸縮領域」において膜蛋白質はゆっくりとした拡散運動をしていた ( $7.1 \text{ nm}^2/\text{ms}$ )。一方、膜伸縮運動が活発な領域では、葉状仮足上で  $100.0 \text{ nm}^2/\text{ms}$ 、糸状仮足上で  $63.3 \text{ nm}^2/\text{ms}$  の拡散運動をしており、拡散速度が9-14倍に上昇していた。細胞運動において、細胞体の平均運動速度が  $0.01 \text{ nm}/\text{ms}$ 、糸状仮足の伸長速度が  $0.2 \text{ nm}/\text{ms}$  であることを考えると、膜蛋白質の拡散速度は細胞体や仮足形成に付随した動きではなく、ほとんどが拡散運動に由来する動きであると考えられる。膜蛋白質は細胞膜を裏打ちするアクチン繊維によって囲い込まれており、これが膜蛋白質の拡散運動を制限している。また、膜伸縮運動はアクチン繊維の重合・脱重合をベースとしている。以上のことを考慮すると、①アクチン繊維の重合・脱重合が不活発な膜の非伸縮領域では、アクチンによるHER2の囲い込

みがタイトなためHER2の拡散速度が遅くなり、②逆にアクチン繊維の重合・脱重合が活発な膜伸縮領域では、アクチンによるHER2の囲い込みがルーズなため拡散速度が早くなると考えられる。実際、楠見 (京大) らはアクチン繊維を阻害剤で破壊すると膜蛋白質の拡散速度が増大することを報告している。即ち本成果から、膜蛋白質動態の解析は、細胞運動のアクチン繊維ダイナミクスを調べる良い指標となることが分かった。また、膜伸縮領域におけるHER2の高拡散性は、HER2とHER1の2量体形成を促進し、仮足形成のさらなる活性化を促しているのであろうと予測される。

次に、ヌードマウスの皮下に PAR1 発現 KPL-4 細胞で腫瘍を作製した後、プローブ (5nM) を静脈注入し独自のイメージング装置で観察した。血管壁をすり抜け間質を通過したプローブは腫瘍細胞の膜蛋白質 HER2 を蛍光ラベルする。がん細胞は血管からの誘引物質 (EGF など) に引き寄せられ、血管方向へ向かって間質中を移動すると思われる。そこで血管からの細胞位置に注目し、「血管から数百  $\mu\text{m}$  離れたがん細胞」と「血管近傍のがん細胞」の HER2 の拡散性を調べた。その結果、血管から遠方の細胞の HER2 は、細胞全体に渡りゆっくりとした拡散性 ( $1.5 \text{ nm}^2/\text{ms}$ ) を示したが、血管近傍の細胞ではそれよりも3倍速い拡散性 ( $4.6 \text{ nm}^2/\text{ms}$ ) を持つことが分かった。さらに血管近傍のがん細胞では、血管に向かって糸状仮足構造を形成しており、この構造上では膜蛋白質の拡散

性が10倍以上上昇する結果(4.6 nm<sup>2</sup>/ms →58.7 nm<sup>2</sup>/ms)を得ることに成功した。以上の結果は、血管近傍の細胞は、遠方の細胞に比べ膜蛋白質HER2がより動的な状態にあり、膜の局所的活性化によって仮足形成を行っていることを示している。*in vitro*の結果を考慮すると、血管近傍の細胞は、遠方の細胞に比べ細胞全体に渡りアクチン繊維の重合・脱重合活性が活発であり、その結果HER2の拡散性が増大し、HER2とHER1の2量体化を促進させていると予想される。HER2とHER1の2量体化は仮足形成をさらに促し、結果として腫瘍細胞の血管方向への運動活性を増強させているのかもしれない。

#### E. 結論

本研究では、独自の*in vivo*イメージング装置を用いてがん転移に重要な腫瘍細胞の膜動態をナノメーター、ミリ秒スケールでイメージングすることに成功した(世界初)。その結果、血管近傍細胞は、遠方の細胞に比べ、アクチン繊維ダイナミクスが活発であり、これによりHER2の拡散性が増大し、HER2とHER1の2量体化を促進している可能性が示唆された。また、この2量体形成は膜の局所的活性化を促し、腫瘍細胞の血管方向への運動性を増加させているのかもしれない。

これまでは技術的な問題のため、このような分解能で腫瘍内の細胞を可視化し、細胞動態を議論することは出来なかった。しかし、本研究によって新たな*in vivo*イメージング法が確立し、*in vivo*における細胞

動態の本質に迫ることが可能となった。今後は、本研究によって開発された*n 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. 健康危険情報

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

Watanabe, T.M., Sato, T., Gonda, K., and Higuchi, H. Three-dimensional nanometry of vesicle transport in a living cell using dual-focus imaging optics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359: 1-7, 2007

##### 2. 学会発表

(1) 権田幸祐、渡邊朋信、樋口秀男、「量子ドットを用いた細胞膜ラフリングのイメージング」、第40回日本発生物学会、第59回日本細胞生物学会合同大会、2007年5月、福岡

(2) 権田幸祐、河合賢朗、大内憲明、樋口秀男、「量子ドットを用いた腫瘍組織の*in Vivo*ナノイメージング」、第16回日本バイオイメージング学会 シンポジウム、2007年11月、東京

(3) 権田幸祐、河合賢朗、大内憲明、樋口秀男、「量子ドットを用いた腫瘍組織の

*in vivo* ナノイメージング」日本学術会議・第51回材料工学連合講演会 オーガナイズドセッション講演、2007年11月、京都

(4) 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.

(5) 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許（公開）

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

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。本年度は昨年度に継続し、生体外から非侵襲的に生体深部の蛍光分布をイメージングするための、超音波による音響光学効果を利用した超音波タグ蛍光イメージング装置の実用化に向けた開発研究を行った。

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で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、超音波タグ蛍光断層イメージング法について検討を行っている。今年度は、昨年度の研究成果により見積もられた到達可能深度を、実際の生体試料を用いて実証するため、実験系の改良と計測実験を行い、同時に実用化に向けての課題について検討を行った。

B. 研究方法

生体組織内に超音波音場が形成されると、屈折率や散乱係数などの光学特性の空間分布が誘起される。進行波の場合音圧の時間的な変化に依存した光強度の変化をもたらす。すなわち媒質内で焦点を

結ぶ集束超音波を利用すると、その焦点において空間選択的に光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場合、励起光や発生した蛍光は強度変調を受け、超音波焦点と蛍光体の位置が一致したときその信号は最大となる。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46.5mm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。今回実用化を視野に入れた装置改良を行い、入射光学

系として光ファイバー系を用いた。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。トランスデューサ設置水槽のみを3軸移動することにより、超音波焦点が測定試料内部を走査し、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。測定には市販の豚モモ肉を用いた。ほぼ均質な筋肉部をX:60×Y:60×Z:80mmに成型したものをを用いた。その中央部には蛍光性微粒子（FluoSpheres carboxylate-modified microspheres 0.04  $\mu$ m, IR 715/755）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レーザ励起による波長726nmのTi:Sapphireレーザを用いた。試料入射光強度は27mWであり、X,Y両軸のステージ走査は、試料中心部20×36mmを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はブタモモ肉試料を用いて断層画像計測を行った結果を3次元表示で示したものである。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。実際に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

本年度研究では、昨年度の研究結果により得られた深さ30mm程度での蛍光画像計測が可能との推定に基づき、入射光学系の光ファイバー化やその他の装置系の改良を図ることにより、深さ30mmに局在する蛍光体の2次元分布を断層画像として計測することにはじめて成功した。一方、本手法の実用化に向けた研究としてアレイ型超音波素子を利用し、焦点走査を機械的走査から電氣的走査へ転換する技術についても並行して検討を進めた。図4にアレイ素子による超音波焦点走査シミュレーションの結果を示す。今後はこの素子と試作した駆動系を用いて、超音波-光プローブの設計を進め、診断装置として求められる実用化技術の研究を推進していく必要がある。

### E. 結論

深さ30mmの生体内部の蛍光物質分布を数mm程度の分解能で画像計測できることを示したこの成果は、本プロジェクトが目的とするセンチネルリンパ節検索などの臨床応用を目的とした蛍光画像計測装置の実用化に向けて大きく前進したことを示すものといえる。

次年度以降は実用化研究として大型動物を用いた実際の生体による実験・検討を行う予定である。

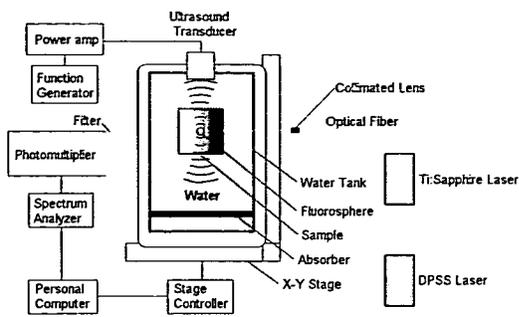


図1 超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック図

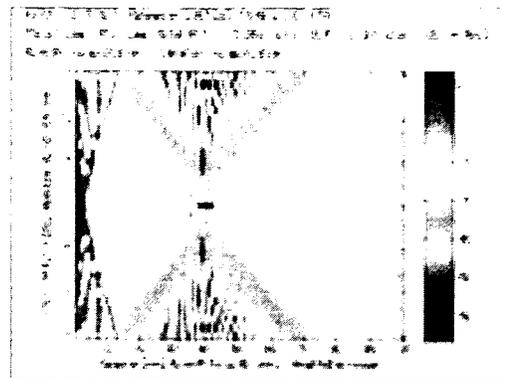


図4 アレイ型超音波素子による集束音場形成のシミュレーション結果

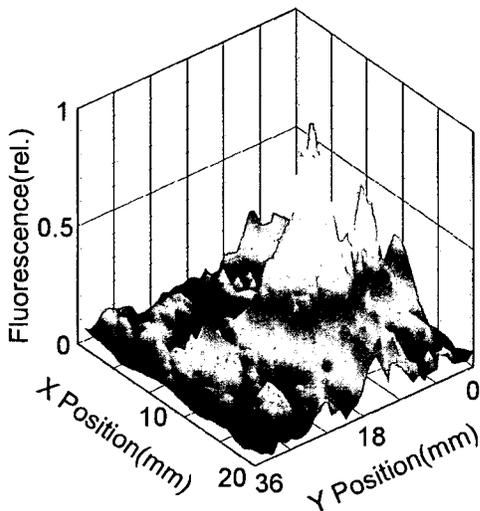


図2 Intralipid-アガロースゲル内に蛍光物質を包埋した生体模擬試料内部の蛍光分布画像

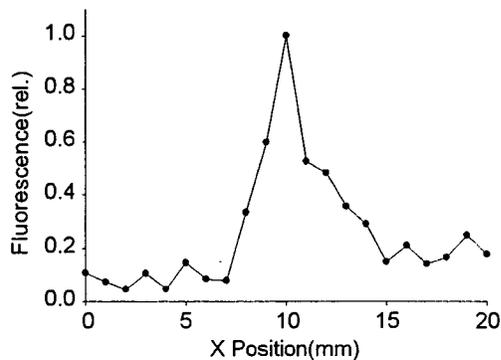


図3 蛍光断層像のX方向プロファイル

## F. 健康危険情報

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

M. Kobayashi, T. Mizumoto, T. Q. Duc, M. Takeda, Fluorescence Tomography of Biological Tissue Based on Ultrasound Tagging Technique, Proc. SPIE 6633, pp. 663306-1-5 (2007)

M Kobayashi, K Sasaki, M Enomoto, Y. Ehara, Highly sensitive determination of transient generation of biophotons during hypersensitive response to cucumber mosaic virus in cowpea. J. Exp. Botany Vol. 58, No.3, pp.465-472 (2007)

### 2. 学会発表

M. Kobayashi, T. Mizumoto, Y. Shibuya, M. Enomoto, M. Takeda, Fluorescence Tomographic imaging using the Ultrasound Tagging Technique. The 9th

International Conference on Optics within Life Sciences (Taipei, Taiwan) (November 26-29, 2006)

T. Q. Duc, T. Mizumoto, Y. Nanbu, M. Takeda, M. Kobayashi, Tomographic Imaging of Fluorophore Embedded in Biological Tissue Based on Ultrasound Tagging Technique. The 7<sup>th</sup> Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO), Abstract pp.1193-1194 (Seoul, Korea)(August, 2007)

水本喬, Trinh Quang Duc, 武田元博, 小林正樹, 音響光学効果を利用した超音波タグ生体蛍光断層イメージング I. 第 54 回応用物理学関係連合講演会講演予稿集, 講演番号 28a-R-5, p.1087 (2007)

水本喬, 榎本幹, 武田元博, 小林正樹, 超音波タグ散乱媒質内蛍光断層イメージング法の検討. レーザー学会学術講演会第 27 回年次大会講演予稿集, 講演番号 E2-17pV14, p. 150 (2007)

大原健, 鈴木祐輔, 水本喬, 榎本幹, 武田元博, 小林正樹, 超音波タグ蛍光イメージング法による生体試料の蛍光断層計測. 平成 19 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-5-50, 講演資料 p. 79 (2007)

山内崇弘, 渡邊尚哉, 小林正樹, 超高感度 CCD を用いたヒト生物フォトンイメージングによる皮膚酸化ストレス計測の検討. 平成 19 年東北地区若手研究者研究発表会,

講演番号 YS-5-08, 講演資料 p. 15 (2007)

菊地大輔, 千葉朋子, 小林正樹, 極微弱発光による化学反応波の動態計測とイメージング. 平成 19 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-5-09, 講演資料 p. 17 (2007)

熊坂増高, 内堀綾斗, 武田元博, 亀井尚, 桜井遊, 大内憲明, 小林正樹, がん転移診断のためのセンチネルリンパ節蛍光イメージング法の検討—ブタを用いた腹腔内視鏡による観察—. 平成 19 年東北地区若手研究者研究発表会, 講演番号 YS-5-10, 講演資料 p. 19 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許 (公開)  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし

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

（分担）研究者 小林 芳男 茨城大学工学部 教授

研究要旨

これまでに、無毒な X 線造影剤の合成を目的として、ヨード系化合物の一つである AgI ナノ粒子のシリカカプセル化法を開発してきた。その方法では、シリカカプセル化の際に触媒としてアミンを用いる。アミンは生体に対して有毒であることが知られている。そこで、本研究では、アミン系触媒を用いない、すなわち amine-free シリカカプセル化法を開発した。また、これまでに開発した方法では、ヨード濃度が  $10^{-3}$  M と低く、X 線造影に用いるには濃縮工程を重ねる必要があった。本研究では、原料の追添加により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も開発した。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。これまでに、無毒な X 線造影剤の合成を目的として、ヨード系化合物の一つである AgI ナノ粒子のシリカカプセル化法を開

発してきた。その方法では、シリカカプセル化の際に触媒としてアミンを用いる。アミンは生体に対して有毒であることが知られている。そこで、本研究では、アミン系触媒を用いない、すなわち amine-free シリカカプセル化法の開発を目的とする。また、これまでに開発した方法では、ヨード濃度が  $10^{-3}$  M と低く、X 線造影に用いるには濃縮工程を重ねる必要があった。本研究では、原料の追添加により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の開発も目的とする。

B 研究方法

1. 各種複合粒子の作製

1-1. amine-freeシリカカプセル化法：過塩素酸銀( $\text{AgClO}_4$ )水溶液をヨウ化カルシウム( $\text{KI}$ )水溶液に添加し、 $\text{AgI}$ 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)、 $\text{NaOH}$ を順に加えることで $\text{AgI}/\text{SiO}_2$ 複合粒子を作製した。 $[\text{AgI}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ とした。

1-2. 追添加シリカカプセル化法：上記のamine-freeシリカカプセル化法により $[\text{AgI}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ となるように各試薬濃度を調整して $\text{AgI}/\text{SiO}_2$ 複合粒子を作製した。これを1サイクルとし、このサイクルを数回繰り返した。

## 2. キャラクターゼーション

粒子の形状を透過型電子顕微鏡(TEM)により調べた。TEM観察用試料は、コロジオン膜貼り付けCuメッシュにコロイド溶液を直接的かして乾燥させることにより作製した。

### 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. amine-freeシリカカプセル化法：図1に種々のTEOS濃度において合成した $\text{AgI}/\text{SiO}_2$ 複合粒子のTEM像を示す。

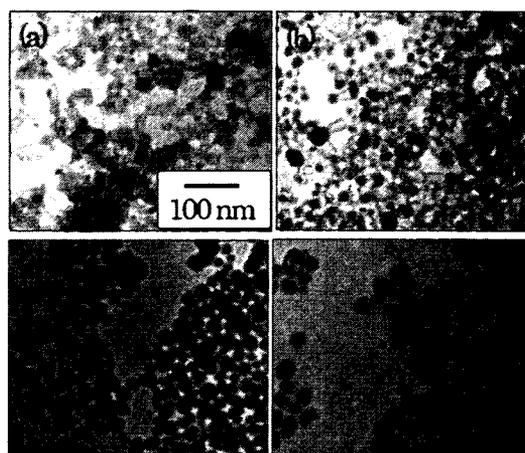


図1 種々のTEOS濃度において合成した $\text{AgI}/\text{SiO}_2$ 複合粒子のTEM像。  
 $[\text{TEOS}] =$  (a) 0.4, (b) 1.0, (c) 4.0, (d) 8.0 mmol/l  
 $[\text{MPS}] = 0.045 \text{ mmol/l}$ ,  $[\text{NaOH}] = 1.1 \text{ mmol/l}$   
 $[\text{KI}] = 2 \text{ mmol/l}$ ,  $[\text{AgClO}_4] = 1 \text{ mmol/l}$   
 $[\text{H}_2\text{O}] = 20 \text{ mol/l}$

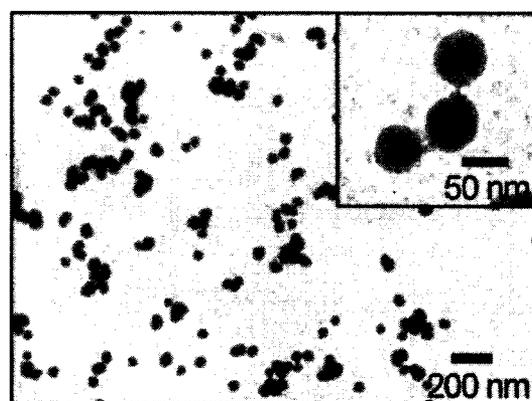


図2 追添加法により調製した $\text{AgI}/\text{SiO}_2$ 複合粒子のTEM像。  
 $[\text{TEOS}] = 0.04 \text{ mol/l}$ ,  $[\text{MPS}] = 0.23 \text{ mmol/l}$ ,  
 $[\text{NaOH}] = 1.1 \text{ mmol/l}$ ,  $[\text{KI}] = 6.0 \text{ mmol/l}$ ,  
 $[\text{AgClO}_4] = 5.0 \text{ mmol/l}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}] = 20 \text{ mol/l}$

TEOS濃度が低いとき(図1(a),(b))は、 $\text{AgI}$ 粒子はカプセル化されず単独の $\text{AgI}$ 粒子の周りにゲル状のシリカ粒子が析出しているのが観察された。TEOS濃度を4.0 mmol/l以上にすると $\text{AgI}$ 粒子はシリカによって良好にカプセル化されるようになった。また各カプセル化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 % (図1(c))、31.6 nmおよび16.6 % (図1(d))で

あり、従来よりも小粒径のAgI/SiO<sub>2</sub>複合粒子を合成することができた。この成果に関しては、The 9th Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society (YUCOMAT 2007) (Herceg Novi, Montenegro, September 2007) で報告した。

2. 追添加シリカカプセル化法：図2に追添加法により調製したAgI/SiO<sub>2</sub>複合粒子のTEM画像を示す。12.7~54.5 nm程度のAgIナノ粒子を包含したシリカカプセル化複合粒子を比較的良好に作製することができた。この成果に関しては、化学工学会第73年会（静岡、2008年3月）で報告する予定である。

#### D 考察

これまで報告してきたAgIナノ粒子のシリカカプセル化法の改良を行った。具体的には、amine-free法および追添加法である。各種濃度条件を変化させると、系のイオン強度が変化する。イオン強度は微粒子の分散凝集状態を決める重要な要素の一つであるため、各種濃度条件は、得られる複合粒子の形態を決める。以上の点を踏まえて、各種濃度を変化させて複合粒子を合成し、TEM観察による結果を総合することによって、良好な複合粒子が生成する適切な条件を見つけることができた。得られたシリカカプセル化AgIナノ粒子は良好なX線造影能を発言することが予想され。実用化に向けた検討が待たれる。

#### 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、新たな医療診断材料としての利用が期待される。そのため、当複合粒子を用いた診断技術の開発も今後の検討課題の一つである。

#### 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) Y. Kobayashi, K. Misawa, M. Takeda, N. Ohuchi, A. Kasuya, M. Konno, "Control of Shell Thickness in Silica-Coating of AgI Nanoparticles," *Adv. Mater. Res.*, **29-30** (2007) 191-194

##### 2. 学会発表

1) 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

2) 湊真理絵、小林芳男、液相法によるAgI/SiO<sub>2</sub>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

3) 湊真理絵、小林芳男、武田元博、粕谷厚生、大内憲明、AgI/SiO<sub>2</sub>複合粒